

DISCIPLINE : Biologie

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

par

Daniel TRAN

**Rôle des Canaux Ioniques de la
Membrane Plasmique lors de la Mort Cellulaire
Programmée induite par l'Ozone chez *A. thaliana***

Soutenue publiquement le 12 Décembre 2011 devant la commission d'examen :

MAZARS Christian	Directeur de Recherche CNRS, Toulouse	Rapporteur
WENDEHENNE David	Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur
MANCUSO Stefano	Professeur, Université de Florence (Italie)	Examineur
NOCTOR Graham	Professeur, Université Paris-Sud 11	Examineur
KAWANO Tomonori	Professeur, Université de Kitakyushu (Japon)	Examineur
THIBAUD Jean-Baptiste	Directeur de Recherche CNRS, Montpellier	Examineur
BOUTEAU François	Maître de Conférences, Université Paris-Diderot 7	Directeur de Thèse

Résumé

L'ozone troposphérique est un polluant secondaire majeur. Outre son rôle de gaz à effet de serre direct, l'ozone fait partie des polluants atmosphériques les plus toxiques et la pollution qu'elle engendre, affecte aussi bien la santé humaine que la productivité végétale. Les travaux présentés dans cette thèse portent sur l'étude du rôle des canaux ioniques de la membrane plasmique en réponse à une forte exposition à l'ozone ainsi que leurs interactions avec les événements de signalisation mis en place lors du processus de PCD induit par ce stress sur des cellules en culture d'*A. thaliana*. Nous avons montré que cette mort cellulaire génétiquement contrôlée est caractérisée par une plasmolyse semblable à « l'Apoptosis Volume Decrease » (AVD) décrit en animal. Ce processus est promu par des cascades de signalisation où, dans un premier temps, les canaux anioniques sont très précocement activés potentiellement par l'acide oxalique issu de la dégradation de l'ascorbate par l'O₃. Les données suggèrent une interconnexion entre les courants anioniques, l'influx calcique et une génération de ROS dépendante de la NADPH oxydase. Dans un deuxième temps, des canaux K⁺ rectifiants sortants sont activés de manière retardée et participent à la PCD. Cette activation retardée pourrait être due à une régulation post-transcriptionnelle des canaux GORK induite par l'O₂^{•-}. Enfin, nous avons également mis en évidence des activités enzymatiques de type caspase, au niveau cytoplasmique et nucléaire. Ces activités enzymatiques semblent être corrélées à la baisse de la teneur vacuolaire en ions K⁺, mais des données complémentaires sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes sous-jacents. Ce travail souligne l'importance et la complexité de la régulation des canaux anioniques et potassiques et ce, dans les processus de signalisation et la mécanistique menant à la mort cellulaire programmée chez les plantes.

Abstract

Tropospheric ozone is a major secondary pollutant. In addition to its role in greenhouse effect gas, ozone is one of the most toxic air pollutants, and its pollution affects both human health and crop productivity. The work presented in this thesis concerns the role of ion channels in the plasma membrane in response to acute exposure to ozone and their interactions with signaling events leading to O₃-induced PCD in *A. Thaliana* cultured cells. We have shown that cell death was genetically controlled and characterized by cell shrinkage similar to the mechanism of "Apoptosis Volume Decrease" (AVD) described in animal. This process is initially promoted by an early activation of a plasma membrane anion channel, amongst which ascorbate-derived oxalic acid production potentially participates to this activation. Our data further suggests an interplay between anion channel with well known plant responses to O₃, Ca²⁺ influx and NADPH-oxidase generating reactive oxygen species (ROS) in mediating the oxidative cell death. In a second step, K⁺ outwards rectifying currents are activated in a delayed manner and participate to PCD. This delayed activation could be due to O₂^{•-} post-transcriptional regulation of GORK channels. Finally, we also demonstrated caspase-like activities in the cytoplasm and the nucleus. These enzyme activities appear to be correlated with the decrease in vacuolar K⁺ ion content, but require additional data to understand the underlying mechanisms. This work highlights the importance and the complexity of ion channels regulation in the signaling pathway and the mechanistic processes leading to programmed cell death in plants.

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier **François**, qui m'a encadré pendant la durée de cette thèse, pour la confiance qu'il m'a accordé, pour ses remarques pertinentes et son optimisme. Ses qualités d'encadrant m'ont permis d'avancer à un rythme régulier dans mes travaux, m'encourageant à persévérer lorsque les résultats obtenus n'étaient pas toujours ceux attendus et par sa disponibilité et de son écoute lors de mes requêtes. J'ai énormément appris à son contact, j'ai sincèrement apprécié travailler avec lui et lui suis reconnaissant pour le temps qu'il m'a consacré et toutes les opportunités qu'il m'a offertes au cours de cette thèse.

Mes remerciements vont également à **Christian Mazars** et **David Wendehenne** pour avoir accepté de rapporter mon manuscrit de thèse. Je remercie également l'ensemble des autres membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail:

- **Stefano Mancuso** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire à l'Université de Florence. Je remercie toute son équipe pour sa gentillesse et plus spécialement **Marika Rossi** pour son aide tout au long de ce séjour.
- **Jean-Baptiste Thibaud** et **Benoît Lacombe** de m'avoir fait part de leurs remarques pertinentes tout au long de mes travaux de thèse et leurs connaissances sur les canaux K⁺.
- **Tomonori Kawano** pour avoir initié ce projet et pour m'avoir permis de découvrir le Japon.
- et **Graham Noctor** pour avoir accepté de présider le jury de thèse.

Je suis également très reconnaissant à **Michel Dron** d'avoir accueilli l'équipe du LEM au sein de l'IBP et qui m'a permis d'effectuer cette thèse dans un environnement favorable. Je remercie également **Jean-Marie Frachisse**, **Olivier Dellis** et **Yves Henri** pour leurs suggestions et remarques effectuées lors du comité de thèse.

Je remercie pour finir mes collègues de l'équipe du LEM. Merci tout d'abord à **Patrice**, ancien collègue avec qui j'ai pu partager de nombreuses discussions aussi bien scientifiques qu'autres sujets et de m'avoir entraîné dans cette expérience. Je remercie encore **Joël** avec qui les conversations sont souvent animées mais aussi pour sa sympathie, son expérience et la justesse de ses remarques. Merci à **Takashi** pour avoir partagé ses connaissances, ses compétences, sa culture, et ses petites friandises japonaises : Arigatô ! Merci également à **Mohamed** avec qui j'ai souvent eu des conversations captivantes. Je lui souhaite également une grande réussite dans ses travaux de thèse (Inch'allah).

*Merci à toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à faire que ma tâche soit menée au mieux au cours de ces trois années: **Bernadette** pour ses précieux coups de main, **Aurélien** pour son knowledge sur ImageJ mais surtout pour sa bonne humeur, **Anne-Marie** et **Michèle** pour leur discussion du midi, **Jean-Pierre Rona**, **Sandra**, et **les membres de l'IBP** avec qui j'ai pu interagir.*

*Un grand merci à ma famille pour tout et pour finir à **Charlotte** pour m'avoir supporté et son soutien sans faille.*

Listes des abréviations

[Ca²⁺]_{cyt} : calcium libre cytosolique	GORK : Guard cell Outward-Rectifier K ⁺
A9C : acide 9 Anthracene Carboxylique	GR : Glutathion Réductase
ABA : ABscissic Acid	GSH : Gluthation
ALMT1 : ALuminum-activated Malate-permeable Transporter	GST : Glutathion-S-Transférase
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique	HR : Hypersensitive Response
AVD : Apoptosis Volume Decrease	IRAC : Inward Rectifying Anion Current
CAT : CATalase	IRC : Inward Rectifying Conductance
CEC : Commission for Environmental Cooperation	JA : Jasmonic Acid
CLC : ChLoride Chanel	Jar1 : JASmonate Response locus 1
CNGC : Cyclic Nucleotide-Gated Channel	KORC : K ⁺ Outward Rectifying Currents
COV : Composés Organo-Volatiles	LSD1 : Lysine-specific demethylase 1
DHA : DéHydroAscorbate	MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
DHAR : DésHydroAscorbate Réductase	MAPKK : MAP kinase kinase
DND1 : Defense No Death 1	MAPKKK : MAP kinase kinase kinase
DPI : DiPhényllodonium	MDHA : MonoDeHydroAscorbate
EGTA : ethylene glycol tetra-acetic acid	MDHAR : MonoDehydroAscorbate Réductase
EIN2 : Ethylene-Insensitive 2	MeJA : méthyl-jasmonate
E_k : potentiel d'équilibre thermodynamique E _i de K ⁺	MSC : MechanoSensitive Channel of Small conductance
ET : Ethylène	NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
GIEC : Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat	noa1 : Nitric Oxide Associated 1
Gli : glibenclamide	NOS : NO Synthase
GluR : Glutamate Receptor	NOx : oxydes d'azote
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique	Npr1 : <i>Nonexpresser of PR 1</i>
GOPX : GuaiacOl PeroXYdase	NSCC : Non Selective Cation Channel
	oji1 : Ozone-sensitive and Jasmonate-Insensitive 1

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORC : Outward Rectifying Conductance

OST1 : Open STomata 1

PCD : Programmed Cell Death

PP2C : protéines phosphatase 2C

PR : Pathogenesis-Related protein

Rboh : Respiratory Burst Oxidase Homologue

RCD1 : Radical-induced Cell Death 1

rif1: Resistant to Inhibition by Fsm 1

ROS : Reactive Oxygen Species

SA : Salicylic Acid

SID2 : Salicylic acid Induction–Deficient 2

SIPK : Salicylate Induced Protein Kinase

SKOR : Stelar K⁺ Outward Rectifier

SLAC1 : SLOW Anion Channel-associated 1

SOD : SuperOxyde Dismutase

TDT : Tellurite-resistance/Dicarboxylate
Transporter

TEA : TetraEthylAmmonium

TPC : Two Pore Channel

TPK : Twin-Pore K⁺

VPE : Vacuolar Processing Enzyme

VRAC : Volume-Regulated Anion Channels

VTC1 : ViTamin C-1

WIPK : Wound Induced Protein Kinase

XOD : xanthine oxydase

Sommaire

REMERCIEMENTS	III
LISTES DES ABREVIATIONS	V
SOMMAIRE	VII
CHAPITRE 1	
INTRODUCTION	11
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	11
1.1 QU'EST-CE QUE L'OZONE ?	11
1.2 EFFETS DE L'OZONE	13
1.2.1 Quelques chiffres	13
1.2.2 Effets nocifs de l'ozone	14
1.3 EVENEMENTS DE SIGNALISATION EN REPONSE A L'OZONE	16
1.3.1 Les formes activées de l'oxygène	16
1.3.1.1 Stress oxydatif induit par l'ozone	16
1.3.1.2 Génération des ROS par la plante	18
1.3.1.2.1 Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)	18
1.3.1.2.2 L'anion radical superoxyde (O_2^\bullet)	18
1.3.1.2.3 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	19
1.3.1.2.4 Le radical hydroxyle ($\text{HO}\bullet$)	20
1.3.1.2.5 Le monoxyde d'azote ($\text{NO}\bullet$)	20
1.3.1.2.6 Les radicaux libres organiques	20
1.3.1.3 Durée de vie des différents ROS et interconnexions possibles entre leurs production	21
1.3.1.4 Sources de production des ROS	23
1.3.1.4.1 Les chloroplastes	23
1.3.1.4.2 La mitochondrie	23
1.3.1.4.3 Les peroxysomes	24
1.3.1.4.4 Le cytosol	24

1.3.1.4.5	L'apoplaste et la membrane plasmique	25
1.3.1.5	Systèmes détoxifiants	26
1.3.1.6	Burst oxydatif : utilisation des ROS lors de la réponse aux stress	27
1.3.1.7	Le burst oxydatif induit par l'O ₃	28
1.3.2	<i>Le monoxyde d'azote (NO)</i>	29
1.3.2.1	Généralités	29
1.3.2.2	Rôles du NO dans la réponse à l'ozone	30
1.3.3	<i>Le calcium</i>	31
1.3.3.1	Généralités	31
1.3.3.2	Variation calcique en réponse à l'ozone	32
1.3.4	<i>Les protéines kinases</i>	33
1.3.4.1	Rôle en réponse à l'ozone	33
1.3.5	<i>Les Hormones (ABA, ET, SA, JA)</i>	34
1.3.6	<i>Ozone et PCD</i>	37
1.4	LES CANAUX IONIQUES CHEZ LES PLANTES	40
1.4.1	<i>Canaux cationiques de la membrane plasmique chez les végétaux</i>	40
1.4.1.1	Canaux potassiques K ⁺	41
1.4.1.1.1	La famille des canaux Shaker	42
1.4.1.1.2	La famille des AtTPK (pour Twin-Pore K ⁺)/KCO	44
1.4.1.1.3	La famille Kir-like	45
1.4.1.2	Canaux cationiques aspécifiques : NSCC	45
1.4.1.2.1	La famille TPC (=Two Pore Channel)	46
1.4.1.2.2	La famille GluR (récepteurs à glutamate)	46
1.4.1.2.3	La famille CNGC	47
1.4.2	<i>Les canaux anioniques de la membrane plasmique chez les végétaux</i>	48
1.4.2.1	Famille des CLC: Canaux Chloride et les échangeurs Proton/Anion	53
1.4.2.2	Canaux/Transporteurs anionique ALMT	53
1.4.2.3	SLAC1 : Canal anionique lent	54
1.4.2.4	Canaux IRAC	55
1.4.2.5	Canaux mécano-dépendant	55
1.4.3	<i>Canaux ioniques et PCD</i>	56
1.4.3.1	Rôle dans la réponse hypersensible	57
1.5	OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE	59

CHAPITRE 2

ROLE DES CANAUX ANIONIQUES EN REPONSE A L'OZONE 60

2.1	INTRODUCTION	61
2.2	INCREASED ANION CHANNEL ACTIVITY IS AN UNAVOIDABLE EVENT IN OZONE-INDUCED PROGRAMMED CELL DEATH.	63
2.3	A ROLE FOR OXALIC ACID GENERATION IN OZONE-INDUCED SIGNALIZATION.	79

CHAPITRE 3**ROLE DES CANAUX POTASSIQUES EN REPONSE A L'OZONE 94**

3.1 INTRODUCTION _____ 95

3.2 POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE GORK CHANNEL BY $O_2^{\bullet-}$ PARTICIPATE TO OUTWARD RECTIFYING K^+
CURRENT INCREASE DURING OZONE INDUCED CELL DEATH IN *A. THALIANA* CELLS. _____ 96**CHAPITRE 4****IMPLICATION DES ACTIVITES DE TYPE CASPASE 113****CHAPITRE 5****CONCLUSIONS & PERSPECTIVES 126****ANNEXES 132**

ANNEXE A1: ARRETE EUROPEEN _____ 145

BIBLIOGRAPHIE**BIBLIOGRAPHIE 135**

Chapitre 1

Introduction

Contexte Bibliographique

Les plantes se heurtent inévitablement à des changements continuels de leur environnement comme les variations de températures, le vent, le manque ou l'excès d'eau, la carence en nutriment, ou bien encore l'attaque par des pathogènes. Ces contraintes environnementales naturelles biotiques ou abiotiques sont perçues comme un stress au niveau de la plante. Du fait de leur ancrage dans le sol, les plantes ne sont pas en mesure de passer à des milieux de vie plus appropriés pour les éviter. Par conséquent, les plantes ont développé des mécanismes et des stratégies d'adaptation en réponse aux fluctuations de leur environnement. Ces réponses comprennent des séries de réactions biochimiques et cellulaires communes très étudiées depuis plusieurs décennies sur différentes espèces végétales. Une multitude de travaux a été menée sur différentes contraintes, telles que les attaques par des microorganismes pathogènes (Alvarez et al., 1998), les ravageurs (Doke et al., 1996), le froid (Prasad, 1996), le choc thermique (Karpinski et al., 1999), les métaux lourds (Richards et al., 1998), les variations mécaniques (Orozco-Cardenas & Ryan, 1999), la sécheresse (Mahajan & Tuteja, 2005), les rayons ultraviolets (UV) (Rao et al., 1996) ou bien les pollutions atmosphériques (Ashmore, 2005). Parmi les pollutions atmosphériques, la pollution à l'ozone a été et reste encore très étudiée aussi bien sur l'animal que sur les plantes du fait de l'important impact important qu'elle peut avoir aussi bien sur la santé humaine ou sur la productivité végétale.

1.1 Qu'est-ce que l'ozone ?

Composé de trois atomes d'oxygène, l'ozone (O_3 , Figure 1) est un composant généré naturellement par action des rayonnements UV sur l'oxygène moléculaire (O_2). Il est présent dans la stratosphère, où il forme la « couche d'ozone », située entre 10 et 40 km au-dessus de la surface de la Terre, et dans la troposphère, entre 0 et 10 km au-dessus de la surface de la Terre (Figure 2).

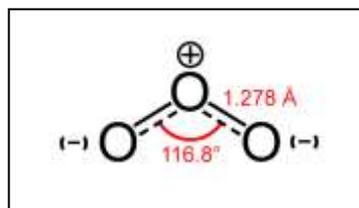


Figure 1. Structure moléculaire de l'ozone

(Source : <http://www.cfa.harvard.edu/hitran/>)

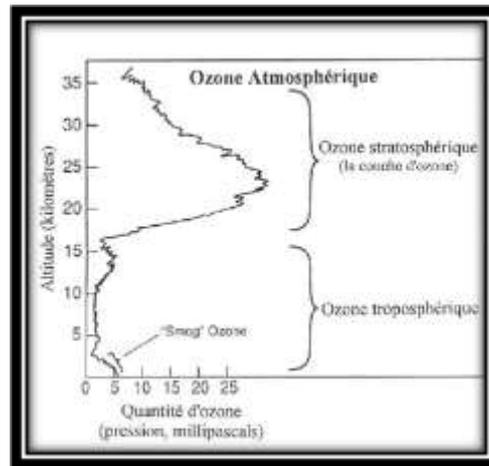


Figure 2. Quantité d'ozone dans l'atmosphère selon l'altitude

(Source : <http://www.aeronomie.be/fr/activites/systeme/ozone.htm>)

L'ozone stratosphérique protège la surface terrestre des rayonnements solaires les plus dangereux, en particulier les UVC et UVB, et de fait permet le développement de la vie sur Terre. L'ozone troposphérique quant à lui, est le troisième gaz à effet de serre le plus important, après le CO₂ et le méthane (CH₄) (CEC, 2008) (CEC pour *Commission for Environmental Cooperation*). Outre son rôle de gaz à effet de serre, l'ozone fait partie des polluants atmosphériques les plus toxiques. L'ozone de basse altitude (troposphérique) résulte de réactions photochimiques entre les composés organo-volatils (COV), les oxydes d'azotes (NOx), en présence du rayonnement solaire et d'une température élevée. Les composés organiques volatils se transforment en radicaux peroxydes. Ces radicaux réagissent avec le monoxyde d'azote (NO) pour donner entre autres du dioxyde d'azote (NO₂). Le rayonnement solaire provoque la dissociation du dioxyde d'azote en monoxyde d'azote et en un atome d'oxygène. Celui-ci réagira avec une molécule d'oxygène pour former de l'ozone (Figure 3).

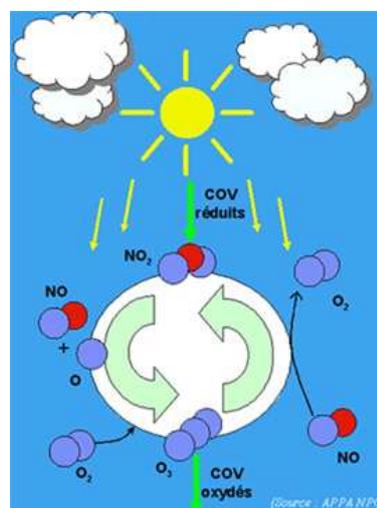


Figure 3. Réaction chimique de la formation de l'ozone.

(Source : Association pour la prévention de la pollution atmosphérique)

Les polluants primaires (l'oxyde de carbone (CO), les NOx, les COV (hydrocarbures),...) émis principalement par l'activité humaine peuvent se transformer dans la basse atmosphère, sous

l'action des rayons solaires et de la chaleur en polluants secondaires (Figure 4) (GIEC, 2007). Les centrales électriques, les gaz d'échappement des véhicules à moteur, les établissements industriels, les vapeurs d'essence et les solvants chimiques en sont les principales sources de polluants primaires. Par exemple, les sources d'émissions de NO_x identifiées sont les combustions d'énergie fossile : parmi celles-ci, la circulation routière est responsable de 55% des émissions et l'industrie avec la production d'énergie, de 23%. Ainsi, dans les zones urbaines, les véhicules sont responsables jusqu'à 75 % des polluants primaires à l'origine de l'O₃ troposphérique.

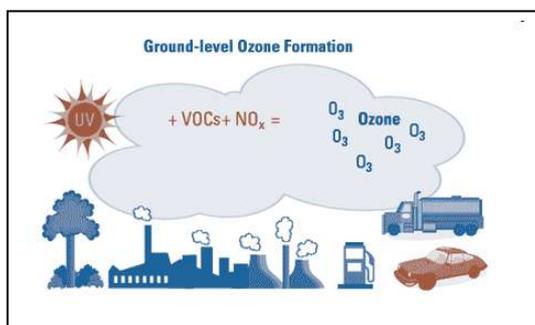


Figure 4. Source des polluants primaires à l'origine de la formation de l'ozone.

(Source : <http://www.seql.org/ozone.cfm>)

Les concentrations d'ozone sont généralement plus élevées l'après midi durant les mois où les températures sont élevées et où la lumière directe du soleil est la plus présente (Figure 5A). Cependant, les polluants participant à la formation de l'ozone peuvent aussi le détruire. En effet, en ville, la pollution associée émise (trafic automobile, foyers de combustion...) consomme en partie l'ozone et limite donc son accumulation. Ainsi, les pollutions à l'ozone les plus fortes peuvent ne pas se rencontrer au même niveau que les sources d'émission mais plus loin. C'est pourquoi cette pollution touche aussi les zones rurales ou périurbaines (Figure 5B).

1.2 Effets de l'ozone

1.2.1 Quelques chiffres

Les concentrations de référence fixées servant à définir le seuil d'alerte et d'information par une Directive Européenne du 12 février 2002 (Directive 2002/3/CE, Annexe A1) sont respectivement de 240 et 180 microgrammes par mètre cube pendant trois heures consécutives. En Europe, de fréquents dépassements du seuil d'information du public ont été constatés dans de très nombreuses régions ces dernières années. Une récente enquête menée par Airparif révélait que 60 % des franciliens respiraient un air de qualité médiocre. De même, 20 à 40 % de la population européenne serait directement impactée par la pollution à l'O₃ dépassant le seuil considéré comme nocif pour la santé humaine avec une exposition moyenne de plus de 35 jours par an à 50µg/m³ (European Environment Agency, 2010). Cette proportion atteignait plus de 60% en 2003.

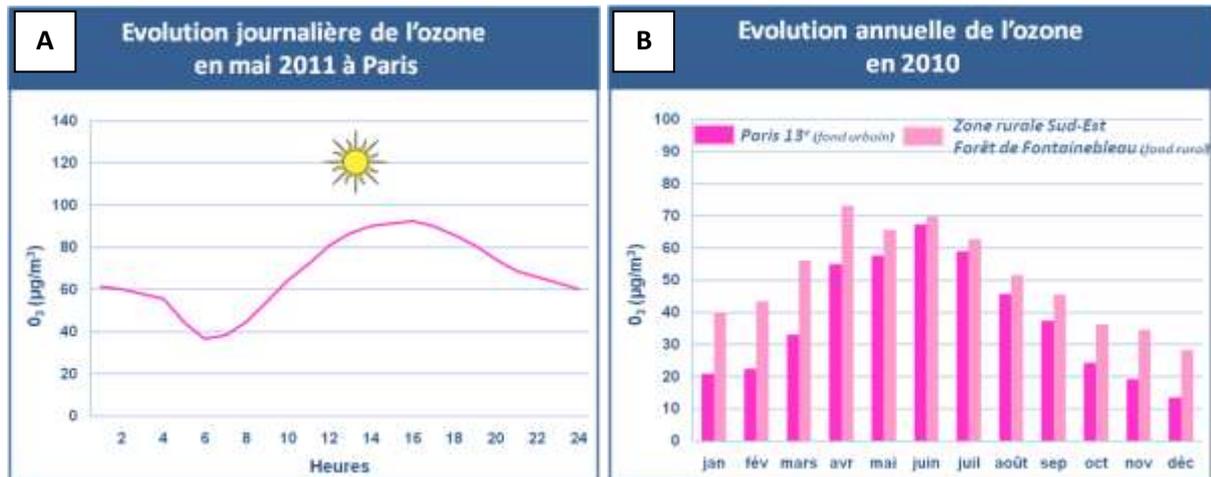


Figure 5. Evolution journalière (A) et annuelle (B) de la concentration en ozone à Paris et en région parisienne.

(Source : Airparif)

1.2.2 Effets nocifs de l'ozone

Du fait de son fort pouvoir oxydant, l'ozone est nocif pour la faune et la flore terrestre. Il s'agit en effet d'un gaz agressif pour les muqueuses. Pénétrant aisément jusqu'aux voies respiratoires les plus fines, il peut ainsi entraîner des irritations oculaires, du nez et de la gorge, des altérations de la fonction pulmonaire, maux de tête, des essoufflements et des toux. Il exacerbe les maladies respiratoires (crises d'asthme, ...). Ses effets sur la santé dépendent du niveau et de la fréquence des expositions mais, chez les personnes sensibles (enfants, asthmatiques, insuffisants respiratoires, allergiques), les symptômes apparaissent plus nettement à partir de $180 \mu g/m^3$ d' O_3 . Il ne semble pas possible de déterminer un seuil en dessous duquel ce polluant serait totalement inoffensif. Si les effets d'une exposition chronique sur le long terme restent encore mal connus, la possibilité d'effets chroniques a été rapportée dans quelques études (Bell et al., 2004). Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 2,4 millions de personnes meurent chaque année de causes directement imputables à la pollution de l'air dont 1,5 millions due aux pollutions intérieures (OMS, 2002). En Europe, plus de 21 000 décès prématurés sont liés à l' O_3 chaque année alors que la perte moyenne de l'espérance de vie due aux particules fines est estimée à neuf mois (GIEC, 2007). Une étude menée par Santé Canada sur la pollution atmosphérique et la mortalité dans huit grandes villes canadiennes, a estimé que, dans ces villes-là, près de 6 000 décès par an pouvaient être attribués à la pollution, dont l'ozone troposphérique est largement responsable (CEC, 2008).

En 2000, il a été estimé que la concentration de l' O_3 troposphérique liée aux activités humaines atteignait 11 300 Terragramme par an (Stevenson et al., 2006). Ces valeurs sont significativement différentes selon le Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC, 2007) avec une estimation moindre de 15%. La concentration de l'ozone dans la troposphère devrait augmenter dans les années à venir (Ashmore et al., 2006). Plusieurs scénarios indiquent que les concentrations d'ozone troposphérique pourraient continuer d'augmenter tout au

long du XXI^e siècle à raison de 0,5 à 2% par an (Gauss et al., 2003); des simulations pour la période allant de 2015 à 2050 prévoient des augmentations de l'ozone troposphérique de 20 à 25 % (Meehl et al., 2007). Ainsi, son impact grandissant suscite beaucoup d'intérêt car les enjeux économiques et écologiques sont très importants.

Au niveau économique, l'incidence de l'ozone sur la productivité végétale a été évaluée pour certaines grandes espèces agricoles pour lesquelles on a enregistré des baisses de rendement de 5 à 10 %. Si le rendement normal était rétabli, la production supplémentaire équivaldrait à plus de 2 milliards de dollars par année rien que pour les Etats-Unis d'Amérique (Murphy et al., 1999; Ashmore, 2005). En effet, de fortes expositions à l'ozone sont néfastes pour la végétation. Elles peuvent réduire la photosynthèse, la croissance, accélérer la sénescence, le vieillissement des tissus, et l'apparition de tâches nécrotiques (Figure 6), correspondant à un processus de mort cellulaire programmée (ou PCD pour *programmed cell death*), peut être observée au niveau des feuilles (Kangasjarvi et al., 1994). Ces effets ont des répercussions à différents niveaux que ce soit économiques, en affectant la qualité et les rendements des récoltes agricoles, mais également au niveau écologique en perturbant des écosystèmes forestiers et plus globalement végétaux (Wieser et al., 2006; Wang et al., 2007). En effet, l'ozone peut interagir et modifier les COV émis par les plantes qui jouent un rôle dans de nombreuses fonctions éco-physiologiques. Ces COV participent à des interactions multi-trophiques entre les plantes, les herbivores et leurs ennemis naturels par exemple, les prédateurs et parasites ainsi que les interactions entre les plantes (communication de plante à plante) (Pinto et al., 2010).

Chez les plantes, lors d'une exposition à l'ozone, celui-ci pénètre par les stomates et se dégrade immédiatement en formes activées d'oxygène (FAO ou *reactive oxygen species*, ROS) générant un stress oxydant. Ces molécules sont aussi connues pour être produites par les plantes lors des stress biotiques (pathogènes, insectes) et abiotiques (sécheresse, luminosité élevée, UV, froid, etc.). On parle alors de « burst oxydatif » dont le rôle peut être multiple comme (i) des effets toxiques contre des pathogènes et/ou (ii) l'activation des voies de signalisation aboutissant à des réactions de défense et parfois à une PCD. Dès lors il est clair que la génération de ROS par l'O₃ dans les tissus de la plante est à même d'induire différents événements intervenant dans le réseau complexe de voies de signalisation participant aux mécanismes de défense des plantes.

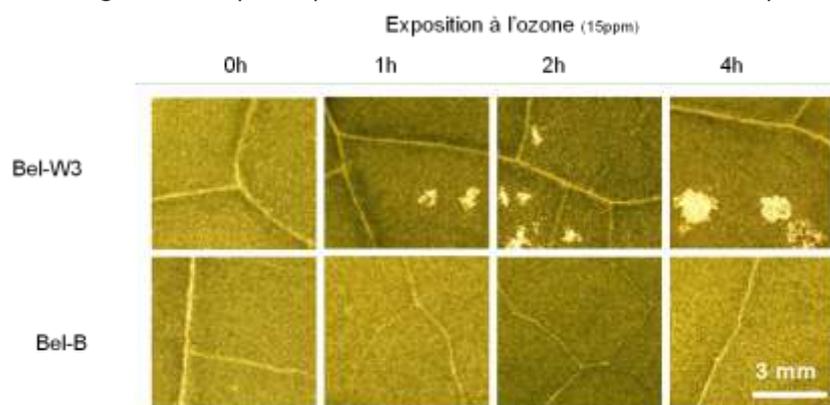


Figure 6. Tâche de nécrose sur feuilles de tabac sensibles à l'O₃ (Bel W3) et résistant à l'O₃ (Bel B) suite à une exposition à l'ozone, d'après Kadono T. et al. (2006).

Je présenterai ici, une liste non exhaustive de différentes données bibliographiques en me concentrant sur les premiers événements moléculaires et cellulaires qui ont été identifiés en réponse à une exposition à l'ozone. Cette première série d'évènement conduit à des modifications complexes dans l'expression des gènes, l'activité enzymatique, et les modifications métaboliques, conduisant à des effets plus tardifs comme les pertes en rendement qui ne seront pas décrites ici. Les principaux événements précoces de signalisation induits par l'ozone chez différents modèles végétaux seront présentés et leur implication dans la mort cellulaire programmée sera discutée dans un premier temps avant de préciser le rôle des canaux ioniques dans ce processus.

1.3 Evènements de signalisation en réponse à l'ozone

1.3.1 Les formes activées de l'oxygène

1.3.1.1 Stress oxydatif induit par l'ozone

L'O₃ peut interagir avec les végétaux de différentes façons et à des niveau différents (1) en phase solide comme par exemple, avec des composants de la cuticule des feuilles des plantes, (2) en phase gazeuse avec les COV émis par les plantes « déstabilisant » ainsi l'équilibre d'écosystèmes à plusieurs niveaux trophiques (Pinto et al., 2010) et (3) en phase liquide au niveau de l'apoplaste suite à l'entrée de l'O₃ par les stomates. L'ouverture/fermeture des stomates est par conséquent un facteur déterminant du sort de la plante lors d'une exposition à l'O₃. La plupart des études ont été portées sur les réactions de l'O₃ dans la phase liquide, car la dissociation de l'O₃ dans l'espace extracellulaire de la feuille est peut-être le plus facile à observer puisqu'il induit des effets notables sur les plantes (Mudd, 1997).

La concentration en O₃ à l'intérieur de la feuille lors d'une exposition à l'ozone est proche de zéro (Laisk et al., 1989), ce qui signifie qu'il est rapidement dégradé. En effet, basé sur des études menées par Weiss (1935), il a été proposé que l'O₃ se dissocie en solutions aqueuses, en fonction de sa concentration en ions hydroxyles, générant ainsi des ROS tels que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ces deux molécules réagissent alors avec les métaux de transition aboutissant à la production de radicaux hydroxyles par la réaction de Haber-Weiss. Grimes et ses collaborateurs (1983) ont démontrés que le taux de formation des radicaux hydroxyles par l'O₃ en solution aqueuse est significativement plus important lorsque des composés phénoliques sont présents, ce qui suggère que des composés biologiques accroissent la réactivité de l'O₃. Plusieurs études menées *in vitro* et *in vivo* (Heath, 1987; Runeckles & Chevone, 1992; Pryor, 1994; Kirichenko et al., 1996) ont confirmé que l'O₃ réagissait avec un ensemble varié de molécules qui peuvent être rencontrées au sein de la paroi cellulaire et à la surface de la membrane plasmique. Ainsi les cibles initiales de l'O₃ comprennent des lipides de la membrane plasmique, les acides aminés de protéines

membranaires ou des enzymes apoplastiques, et différents métabolites organiques localisés dans la paroi cellulaire (Kanofsky & Sima, 1995). Potentiellement, les produits d'ozonolyse (Figure 7) ou de l'oxydation des lipides et/ou des métabolites contenant des doubles liaisons carbone (Heath, 1987; Runeckles & Chevone, 1992) et des protéines modifiées de la membrane plasmique (Dominy & Heath, 1985; Castillo & Heath, 1990) peuvent servir de signaux initiaux conduisant aux réponses cellulaires induites par l' O_3 .

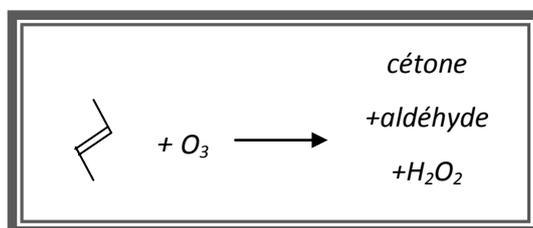


Figure 7. Mécanisme d'ozonolyse des doubles liaisons carbonées.

La toxicité des radicaux générés envers les substrats organiques est directe, mais aussi indirecte, car ils peuvent réagir avec d'autres molécules (ROS, antioxydants,...) et ainsi donner naissance à d'autres formes de ROS. Les radicaux libres sont caractérisés par leur grande réactivité chimique et une courte durée de vie. L'oxygène est à l'origine de la plupart des radicaux libres formés dans l'organisme. Ces radicaux libres de l'oxygène comportent un ou plusieurs atomes d'oxygène qui se trouvent soit sous une forme de radical libre, soit sous forme protonnée. Les ROS sont généralement considérées comme des molécules phytotoxiques car ils endommagent les protéines, les lipides, les glucides, et les acides nucléiques (Foyer & Noctor, 2005).

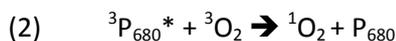
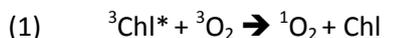
Cette production exogène de ROS par l' O_3 est prise en charge dans l'apoplaste par les systèmes antioxydants. La capacité antioxydante apoplastique est le deuxième facteur déterminant concernant le sort de la feuille après la régulation de l'ouverture stomatique. L'ascorbate notamment, assure une protection importante contre les effets nocifs des ROS générés par l'ozone en les éliminant (Luwe et al., 1993). Ainsi, des lignées de tabac antisens pour l'ascorbate peroxydase ou des mutants d'*Arabidopsis* déficients dans la biosynthèse de l'ascorbate sont plus sensibles à l' O_3 (Conklin et al., 1996; Orvar & Ellis, 1997). Cependant, le rôle de l'ascorbate apoplastique dans la réponse à l' O_3 , n'est pas encore parfaitement compris. Il est maintenant largement accepté que l' O_3 est perçu au niveau de l'apoplaste. Pourtant, comment les cellules perçoivent ou détectent les molécules réactives de l'oxygène au niveau apoplastique est encore largement non élucidé. Trois mécanismes différents pourraient être impliqués dans la détection de l' O_3 /ROS: (a) la perception par une protéine réceptrice apoplastique, qui est directement modifiée par les ROS générés par l' O_3 , ou qui détecte un autre composant modifié par l' O_3 /ROS présent dans la apoplaste (Baier et al., 2005); (b) l'oxydation des lipides de membrane plasmique entraînant la formation de molécules lipidiques (péroxydes lipidiques, acides linoléique...) connues pour induire des évènements de signalisation, ou (c) un changement dans l'équilibre redox cellulaire total en raison de l'action du couple O_3 /ROS sur substances redox actives, tels que l'acide ascorbique, le glutathion ou la balance cellulaire NAD(P)H/NAD(P). Ces évènements alternatifs ne peuvent pas être considérés comme exclusifs, car ils

peuvent tous être impliqués dans les différentes voies de signalisation individuelle provoquées par l'O₃. Si différentes formes de ROS sont générées à partir de l'O₃ dans l'apoplaste, l'O₃ est également connu pour induire une production endogène de ROS par la plante. Les dégâts entraînés par l'O₃ correspondent donc à un très fort stress oxydant. Lors de la vie de la plante, différentes formes de ROS peuvent être produites de façon endogène. En effet, les plantes utilisent l'oxygène, via le métabolisme aérobie, pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur développement. Cependant, la réduction de l'oxygène par les cytochromes de la chaîne respiratoire s'accompagne inévitablement d'une production de radicaux oxygénés, soit par transfert d'énergie soit par des transferts d'électrons. Ce dernier conduit d'une part à la formation de l'oxygène singulet (¹O₂), et d'autre part conduit à l'anion radical superoxyde (O₂^{•-}) après réduction. Aussi, diverses oxydases et les peroxydases au niveau apoplastique peuvent générer des ROS en réponse à certaines modifications de l'environnement (Gill & Tuteja, 2010). Il est aujourd'hui reconnu que leur synthèse, liée aux métabolismes respiratoire et photosynthétique, joue un rôle essentiel dans la vie et la mort de la cellule végétale (Gratao et al., 2005). En effet, elles peuvent jouer un rôle opposé à celui de molécules délétères, et agir comme des molécules de la signalisation cellulaire pour mettre en place des mécanismes de défense vis-à-vis d'un stress, qu'il soit d'origine biotique ou abiotique (Vranova et al., 2002).

1.3.1.2 Génération des ROS par la plante

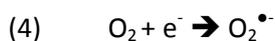
1.3.1.2.1 Oxygène singulet (¹O₂)

Une transformation par transfert d'énergie du dioxygène permet la production de l'oxygène singulet : un électron est élevé à une orbitale d'énergie plus élevée, libérant ainsi l'oxygène de son état de spin-restreint. Sa formation résulte généralement d'une excitation photochimique de la chlorophylle du photosystème II avec l'oxygène (Krieger-Liszkay et al., 2008). D'autres sources de production peuvent exister avec par exemple à partir d'ascorbate (Kanofsky & Sima, 1991).



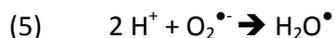
1.3.1.2.2 L'anion radical superoxyde (O₂^{•-})

Le premier produit issu de la réduction de l'oxygène moléculaire est l'anion superoxyde O₂^{•-}:

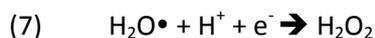
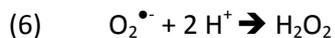


Cette réduction à un électron nécessite un faible apport d'énergie, souvent fourni par des systèmes enzymatiques à NAD(P)H comme par exemple la NADPH oxydase de la membrane plasmique ou du peroxysome. Les étapes de réduction ultérieures ne nécessitent pas d'énergie et peuvent intervenir spontanément. Le radical O₂^{•-} a une durée de vie de l'ordre de quelques secondes. A pH physiologique, il est peu réactif en milieu aqueux, ce qui lui permet de se déplacer assez loin de son lieu de production. En revanche, sa charge électrique le rend incapable de diffuser à travers les

membranes biologiques. A pH acide, il est en équilibre avec sa forme protonnée, le radical perhydroxyle ($\text{H}_2\text{O}^\bullet$), plus lipophile et donc capable de peroxyder les lipides :



En solution aqueuse et à pH neutre ou légèrement acide, tel que l'on rencontre au niveau des parois cellulaires chez les végétaux, ces deux formes se dismutent spontanément en peroxyde d'hydrogène :

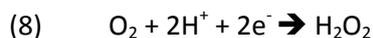


A pH neutre, cette réaction est catalysée par des superoxydes dismutases (MnSOD, FeSOD, Cu/ZnSOD), métallo-enzymes qui catalysent la dismutation du radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ au niveau du cytosol, des chloroplastes et des mitochondries.

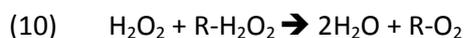
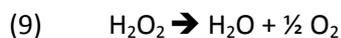
La toxicité de ce radical envers les substrats organiques est directe, mais aussi indirecte, car il s'accompagne généralement d'une production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'autres formes de ROS comme le radical hydroxyle (Cf. réactions (6) et (12)). Aussi, en présence de métaux de transition tels que le cuivre et le fer, d'autres réactions ont lieu, par exemple par le biais du mécanisme Haber-Weiss (Cf. réaction (15)) ou la réaction de Fenton (Cf. réaction (14)) résultant à la formation des radicaux hydroxyles (HO^\bullet). $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut également réagir avec une autre molécule de signalisation importante, le monoxyde d'azote (NO^\bullet) donnant le peroxynitrite (OONO^\bullet) (réaction (16)).

1.3.1.2.3 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

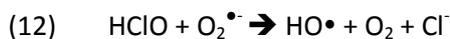
Le peroxyde d'hydrogène est une forme active de l'oxygène plus stable et moins réactive que l'anion superoxyde. Il se forme soit par réduction divalente de l'oxygène moléculaire, soit par dismutation de l'anion superoxyde (Cf. réactions (6) et (7)). Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé n'est pas un radical libre, car tous ses électrons sont appariés, mais il s'agit malgré tout d'un intermédiaire réduit toxique qui possède une durée de vie relativement longue (quelques secondes à quelques minutes).



L'absence de charge électrique à sa surface le rend lipophile et donc capable de traverser les membranes biologiques. De plus, de part sa grande similitude chimique avec l'eau (H_2O), il peut traverser les membranes au travers des aquaporines et donc atteindre des zones éloignées de son lieu de production. Le peroxyde d'hydrogène est soit dégradé en eau et dioxygène (réaction (9)), spontanément ou par l'intermédiaire de catalases, soit utilisé par des peroxydases telles que l'ascorbate peroxydase ou la glutathion peroxydase (réaction (18)).



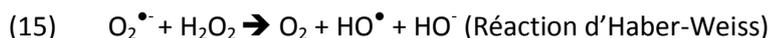
En présence de chlorure, le peroxyde d'hydrogène est transformé par des chloroperoxydase, telles que les myéloperoxydases chez les mammifères, en hypochlorite HOCl. Celui-ci sous l'influence de l'anion superoxyde, est transformé en radical hydroxyle.



1.3.1.2.4 Le radical hydroxyle (HO•)

Le radical hydroxyle représente le plus puissant oxydant à un électron connu. Il est extrêmement réactif et interagit instantanément avec les sucres, les acides aminés, les acides nucléiques, les lipides et en particulier les phospholipides. De part sa capacité à initier des réactions radicalaires en chaîne, il est un responsable majeur de modifications irréversibles de macromolécules et de dommages aux organites. Son temps de demi vie est extrêmement court (10^{-9} secondes), il n'interagit donc qu'avec des molécules présentes dans son voisinage immédiat.

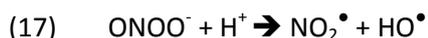
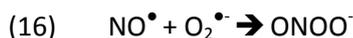
Il peut être formé directement à partir d'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène, mais en conditions normales, ces réactions sont très lentes et inefficaces pour produire des quantités importantes de radicaux hydroxyles. En revanche des quantités significatives peuvent être produites dans un environnement contenant des métaux tels que le fer (Fe^{2+}) ou le cuivre (Cu^{2+}).



Les métaux agissent alors comme catalyseurs. Leurs présences et accessibilités sont probablement les facteurs déterminant la formation de radicaux hydroxyles à un site donné.

1.3.1.2.5 Le monoxyde d'azote (NO•)

Le monoxyde d'azote est un radical produit à partir de l'arginine par la NO-synthase chez les animaux. Chez les plantes, les voies de biosynthèse restent en revanche non élucidées. En présence de l'anion superoxyde, il donne l'anion peroxynitrite ONOO^- qui en milieu acide génère deux radicaux, NO_2^\bullet et HO^\bullet :

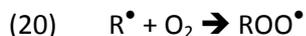
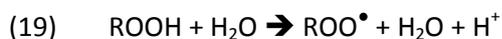
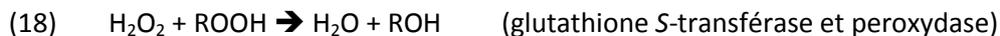


Le peroxynitrite est relativement stable et capable de traverser la membrane plasmique *via* les canaux anioniques (Denicola et al., 1998). Il est désormais évident que l'oxyde nitrique (NO^\bullet), au même titre que l' H_2O_2 , joue des rôles de signalisation dans différents processus physiologiques chez les plantes, tels que l'induction de réponses de défense, la reproduction, la croissance et le développement (Grun et al., 2006; Moreau et al., 2010). Le rôle du NO sera décrit dans une section suivante.

1.3.1.2.6 Les radicaux libres organiques

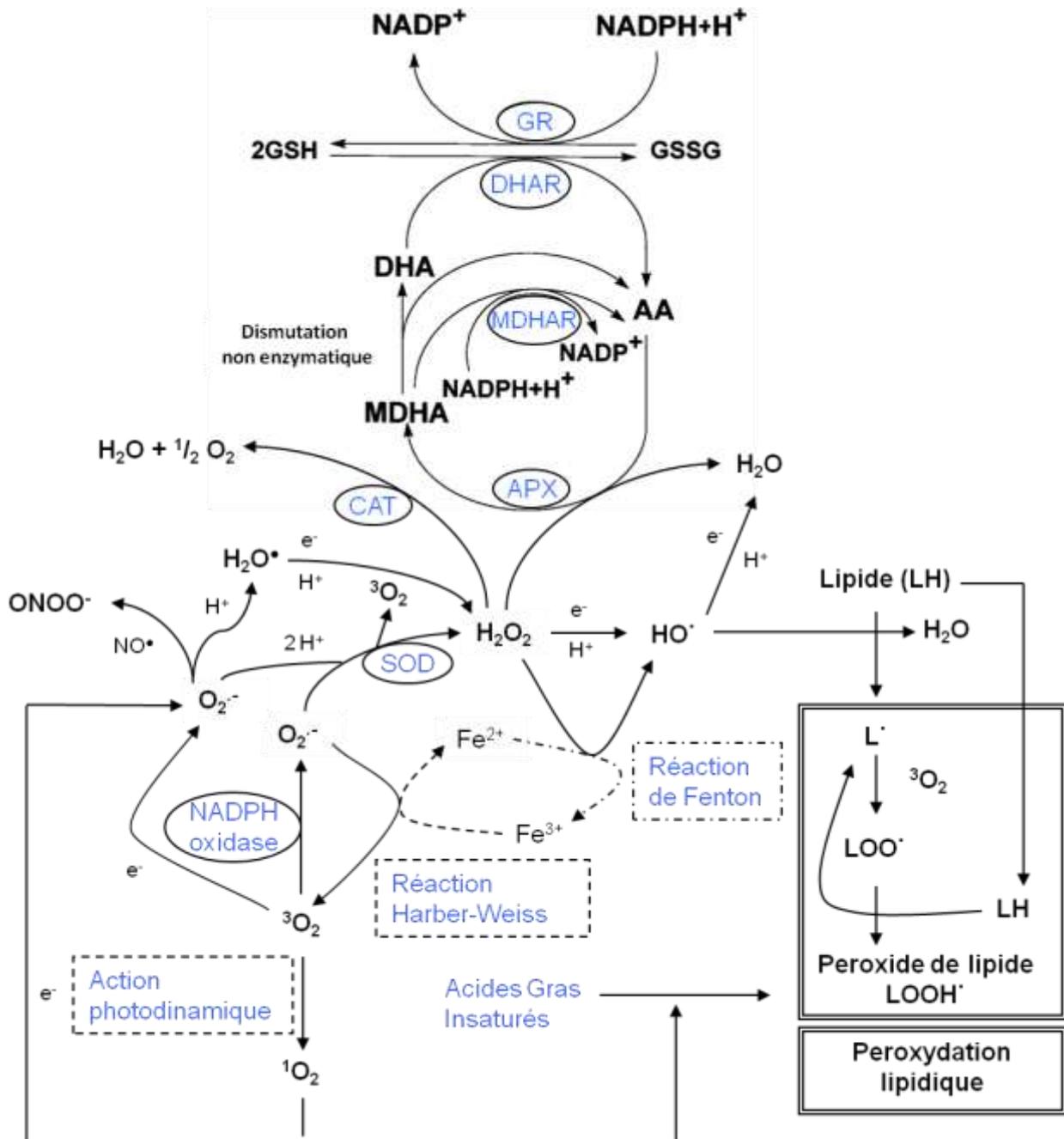
Les radicaux peroxydes (ROO^\bullet) sont formés par l'addition d'oxygène moléculaire sur des radicaux libres (R^\bullet , réaction (20)). Ils sont peu réactifs mais capables de diffuser à travers les

membranes biologiques. Les hydroperoxydes organiques (ROOH) sont les formes protonnées des radicaux peroxydes. Ils sont très réactifs et se redécomposent en radicaux peroxydes (réaction (19)) ou en radicaux alcoyles (RO[•], réaction (21) et (22)). Les radicaux alcoyles sont formés lors de la dégradation des peroxydes organiques. Ils sont très réactifs avec une demi-vie de 10⁻⁶ secondes.



1.3.1.3 Durée de vie des différents ROS et interconnexions possibles entre leurs production

La figure 8 résume les voies de biosynthèse classique des différents ROS dans les cellules végétales.



ROS	¹ O ₂	O ₂ • ⁻	H ₂ O ₂	HO•	H ₂ O•	NO•	ONOO•	NO ₂ •	ROO•	ROOH	RO•
Temps ½ vie (sec.)	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁹	10 ⁻⁶	10 ⁻³ -10 ⁻²	10 ⁻⁹	10 ⁻³	10 ⁻¹ -10 ⁻³	10 ⁻¹ -10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻³	10 ⁻⁶
Toxicité	++	+	+	+++	+	++	++	+	++	++	++

Figure 8. Voie de génération des ROS chez les plantes et leurs temps de demi-vie.

Abréviations : l'anion peroxynitrite, ONOO• ; peroxyde d'hydrogène, H₂O₂ ; monoxyde d'azote, NO• ; l'anion superoxyde, O₂•⁻ ; radical hydroxyl, HO• ; oxygène singulet, ¹O₂ ; radicaux peroxydes, LOO• ; hydroperoxydes organiques, LOOH ; radicaux alcoxydes, LO• ; superoxyde dismutase, SOD ; catalase, CAT ; ascorbate peroxydase, APX ; monodehydroascorbate reductase, MDHAR ; dehydroascorbate reductase, DHAR ; glutathione reductase, GR.

D'après Noctor & Foyer, 1998 ; Vranová et al., 2002 ; Moreau et al., 2010.

1.3.1.4 Sources de production des ROS

Les ROS sont produits de façon continue dans différents compartiments de la cellule, en tant que sous produits du métabolisme cellulaire (Figure 9).

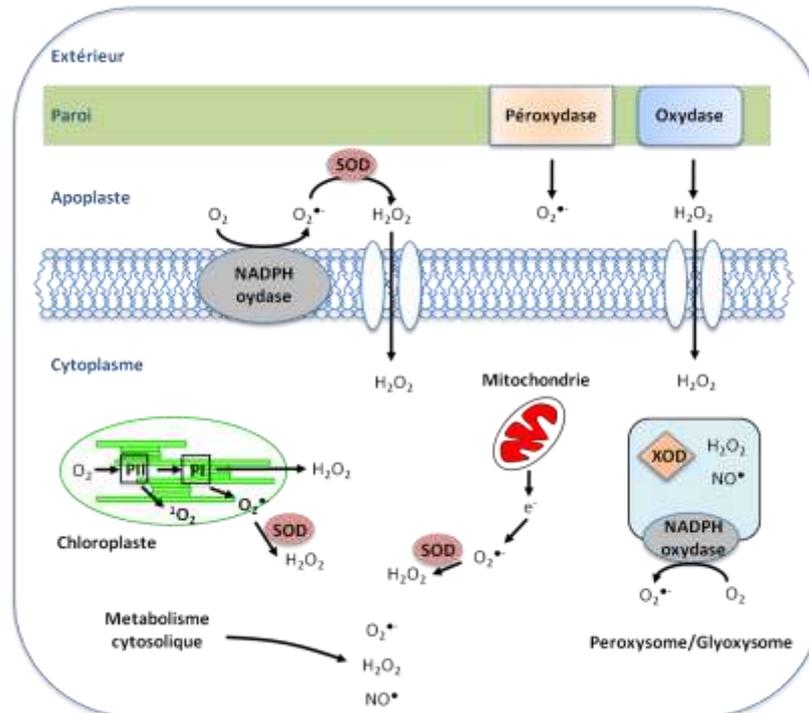


Figure 9. Origine des ROS produits par la cellule végétale.

Schéma modifié d'après Mahalingam et Fedoroff, 2003.

1.3.1.4.1 Les chloroplastes

A la lumière, les ROS sont produits majoritairement dans les chloroplastes. Les différents types de processus liés à cette production sont étroitement associés à la photosynthèse. Ils font intervenir le photosystème I qui permet la photoréduction directe de l'oxygène moléculaire, ainsi que les réactions liées au cycle respiratoire et faisant intervenir la Rubisco. Les radicaux superoxydes ainsi générés au niveau du chloroplaste sont rapidement convertis en H_2O_2 par les CuZn-superoxyde dismutases. Enfin, durant la photosynthèse, l'oxygène singulet est continuellement produit par le photosystème II. Au cours de stress lumineux entraînant la photoinhibition du photosystème II, la production d'oxygène singulet augmente de façon drastique.

1.3.1.4.2 La mitochondrie

La réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires s'accompagne d'une formation parallèle d'environ 2% d'anion superoxyde, d' H_2O_2 et éventuellement de radicaux $HO\cdot$. La production mitochondriale de ROS dépend fort logiquement de la disponibilité en oxygène. Chez les mammifères, les mitochondries sont la source majeure de ROS dans la cellule. Leurs contributions chez les plantes sont plus faibles, sans doute du fait de la présence de l'alternative oxydase (AOX). Celle-ci catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire par l'ubiquinone, et entre de ce fait en

compétition avec les cytochromes pour la consommation d'électrons. L'hypothèse de l'implication de l'AOX dans la réduction de la production de ROS par les mitochondries est notamment supportée par le fait que l' H_2O_2 induit l'expression de ces enzymes (Apel & Hirt, 2004).

Par ailleurs, la formation du NO suite à la réduction du nitrite via une nitrite réductase a été montrée comme dépendante du transport d'électrons mitochondrial (Planchet et al., 2005). Toutefois, cette voie de biosynthèse du NO semble être localisée dans les racines, où la tension en oxygène est faible (Gupta et al., 2005).

1.3.1.4.3 Les peroxysomes

Les peroxysomes sont des micro-granules habituellement sphériques délimitées par une bicouche lipidique unique. Les peroxysomes sont des organites intracellulaires avec un métabolisme de type essentiellement oxydatif et sont probablement un des principaux sites de production de ROS intracellulaires (Nyathi & Baker, 2006), avec les mitochondries et les plastes. Plusieurs études ont clairement montré que les peroxysomes chez les plantes ont des caractéristiques distinctes par rapport à d'autres organismes, bien qu'ils partagent certaines caractéristiques communes comme la détoxification de H_2O_2 par la catalase. L'une des caractéristiques remarquables des peroxysomes chez les plantes est la plasticité de leurs fonctions. Les peroxysomes sont connus pour se différencier en fonction du type cellulaire. Par conséquent, ils sont subdivisés en trois catégories différentes, à savoir les glyoxysomes, les peroxysomes foliaires et les peroxysomes non spécialisés. Les glyoxysomes sont présents dans les cellules des organes de stockage, tels que l'endosperme et les cotylédons, au cours de la croissance post-germinative de plantes oléagineuses, ainsi que dans les cellules des organes sénescents (Beevers, 1982; Nishimura et al., 1996). Ils jouent un rôle important dans le métabolisme lipidique. Comme les mitochondries et les chloroplastes, les peroxysomes produisent les radicaux $O_2^{\bullet-}$ en raison de leur métabolisme. Deux sites de génération d' $O_2^{\bullet-}$ sont établis dans les peroxysomes. Le premier se situe dans la matrice des organites, où la xanthine oxydase (XOD) catalyse l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine en acide urique. Le deuxième site est dans la membrane des peroxysomes, où une petite chaîne de transport d'électrons, composée d'une flavoprotéine à NADH et du cytochrome b, produit le radical $O_2^{\bullet-}$. La monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) participe également à la production $O_2^{\bullet-}$ au niveau des membranes des peroxysomes. Les principaux processus métaboliques responsables de la production de H_2O_2 dans différents types de peroxysomes sont la réaction photorespiratoire de la glycolate oxydase, la β -oxydation des acides gras (del Rio et al., 2006), la réaction enzymatique des oxydases flavine, et la dismutation du radical $O_2^{\bullet-}$. Il a été démontré que les radicaux NO sont également produits dans les peroxysomes (del Rio et al., 2004; Corpas et al., 2009).

1.3.1.4.4 Le cytosol

Diverses réactions enzymatiques peuvent produire des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène dans le cytosol. Chez les organismes aérobies, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont formés par la voie des pentoses phosphates, ainsi que dans le catabolisme des

acides aminés et des acides gras. Le monoxyde d'azote peut être synthétisé par la nitrate réductase cytosolique. D'une manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production de ROS.

1.3.1.4.5 L'apoplaste et la membrane plasmique

Les ROS sont également produits au niveau de la membrane plasmique ou au niveau extracellulaire dans l'apoplaste chez les plantes par plusieurs enzymes. Parmi lesquelles sont notamment impliquées les NAD(P)H oxydases, les peroxydases dépendantes du pH de la paroi cellulaire, les lipoxygénases, et dans une moindre mesure diverses oxydases extracellulaires (oxalate ou germinine-like oxydases, amine-oxydases, xanthine oxydases) (Bolwell & Wojtaszek, 1997).

a) Les peroxydases

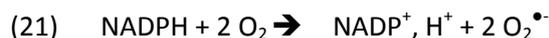
Les peroxydases de la paroi cellulaire sont activées à un pH alcalin et catalysent l'oxydation du NAD(P)H pour permettre la formation d'anion superoxyde puis du H₂O₂. Ainsi, l'alcalinisation de l'apoplaste lors de la reconnaissance d'éliciteur précède la stimulation du métabolisme oxydatif et la production de H₂O₂ par une peroxydase (Bolwell & Wojtaszek, 1997). De nombreuses peroxydases sont localisées au niveau apoplastique, et sont liées de façon covalente ou ionique aux polymères de la paroi (Apel & Hirt, 2004).

b) Les lipoxygénases

Les lipoxygénases sont quant à elles souvent à l'origine de la synthèse de radicaux libres et libèrent des formes actives d'oxygène par hydroperoxydation d'acides gras tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique. Les peroxydes lipidiques libérés lors de ces réactions serviraient de précurseurs à la synthèse de l'acide jasmonique.

c) La NADPH oxydase

La NADPH oxydase possède un rôle majeur dans la mise en place du burst oxydatif chez les plantes. Elle catalyse l'oxydation du NADPH selon la réaction :

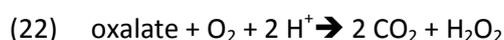


Les électrons sont transférés du NADH cellulaire à l'oxygène extracellulaire. L'anion superoxyde relargué à l'extérieur de la cellule est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène. L'utilisation d'inhibiteurs de NADPH oxydases de mammifère, le diphényliodonium (DPI), permet de bloquer le burst oxydatif après élicitation dans différents systèmes végétaux (Levine et al., 1994; Jabs et al., 1997; Jiang & Zhang, 2003). Les gènes codant pour des homologues à la sous-unité gp91^{phox} de la NADPH oxydase de mammifère ont été clonés. Ces homologues alors dénommés *RBOH* pour *respiratory burst oxidase homologue*, sont rencontrés chez le riz (Groom et al., 1996), *Arabidopsis thaliana* (Desikan et al., 1998; Keller et al., 1998; Torres et al., 1998), la tomate (Amicucci et al., 1999), la pomme de terre (Yoshioka et al., 2001), le tabac (Simon-Plas et al., 2002) et le maïs (Lin et al., 2009). Ces isoformes végétales ont toutes la particularité de posséder une extension N-terminale

cytosolique ayant deux motifs *EF-hands* permettant la fixation du Ca^{2+} (Torres & Dangl, 2005). Ces enzymes seraient impliquées dans l'activation de réponses de défense chez les plantes. Chez *Arabidopsis*, trois groupes ont été distingués selon l'expression des transcrits dans la plante, ceux présents dans toute la plante (*Atrboh D* et *F*), dans les racines (*Atrboh A, B, C, E, G* et *I*), et dans le pollen (*Atrboh H* et *J*) (Sagi & Fluhr, 2006; Glyan'ko & Ischenko, 2010). De plus, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les autres sous-unités de NADPH oxydase de mammifères a permis de mettre en évidence des protéines de tailles similaires dans des extraits de plantes (Dwyer et al., 1996; Xing et al., 1997; Desikan et al., 1998). Pourtant, aucun gène codant pour ces sous-unités n'a depuis été identifié chez les plantes, et leur présence n'a pas été révélée dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*.

d) Les autres oxydases

La germine ou oxalate oxydase est une autre enzyme capable de produire des ROS chez l'orge et le blé (Dumas et al., 1995; Zhang et al., 1995; Requena & Bornemann, 1999). Deux gènes codant pour cette enzyme ont été identifiés chez l'orge (Zhou et al., 1998). Les transcrits et l'activité de cette enzyme sont fortement élicités chez l'orge après infection par un pathogène (Wei et al., 1998). L'expression transitoire de ce gène confère une résistance aux pathogènes chez la tomate (Walz et al., 2008) et au stress oxydatif chez le tabac (Wan et al., 2009). L'acide oxalique est une toxine sécrétée par différents Ascomycètes phytopathogènes, et apparaît comme un élément essentiel dans la pathogénie de ceux-ci (Zhou & Boland, 1999; Cessna et al., 2000). En effet, l'oxalate par son acidité (Bateman et Beer, 1965) peut d'une part, être toxique pour la plante et d'autre part, peut favoriser l'activité de plusieurs enzymes sécrétées par des champignons lors de l'invasion des tissus de la plante car leur activité est maximale à pH faible. De plus, l'acide oxalique est capable de supprimer le burst oxydatif induit lors de l'infection par *Sclerotinia* et de chélater les ions calcium neutralisant ainsi les réponses de défenses de la plante (Cessna et al., 2000).



1.3.1.5 Systèmes détoxifiants

Chez les plantes, les ROS sont donc produits en permanence et résultent des sous-produits métaboliques de diverses voies localisées dans différents compartiments cellulaires (Noctor & Foyer, 1998). Du fait de leur forte réactivité et toxicité, ces molécules sont prises en charge par différents systèmes antioxydants qui sont souvent présents dans des compartiments particuliers. Les systèmes antioxydants existant chez les plantes sont essentiellement constitués de métabolites de faibles poids moléculaires tels que l'acide ascorbique (ASH), la glutathion (GSH), des composés phénoliques, des alcaloïdes, des acides aminés non protéiques, l' α -tocophérol, les caroténoïdes et les flavonoïdes. Ces métabolites sont associés à différents systèmes enzymatiques participant à la reconstitution des molécules antioxydantes,

- la réductase monodéhydroascorbate (MDHAR) : $2 \text{MDHA} + \text{NADPH} \rightarrow 2 \text{ASH} + \text{NADP}^+$

- la réductase déhydroascorbate (DHAR) :
2 Monodéhydroascorbate (MDHA) \rightarrow ASH + déhydroascorbate (DHA)
DHA + 2 Glutathion (G-SH) \rightarrow ASH + GS-SG
- la glutathion réductase (GR) : GS-SG + NADPH + H⁺ \rightarrow 2 G-SH + NADP⁺

ou bien des enzymes participant à la prise en charge des ROS comme :

- la superoxide dismutase (SOD) : O₂^{•-} + O₂^{•-} + 2 H⁺ \rightarrow H₂O₂ + O₂
- l'ascorbate peroxydase (APX) : 2 ASH + H₂O₂ \rightarrow 2 MDHA + H₂O
- la glutathion peroxydase (GPX) : 2 GSH + H₂O₂ \rightarrow GS-SG + 2 H₂O
- peroxydase guaiacol (GOPX) : 4 guaiacol + 4 H₂O₂ \rightarrow Tetraguaiacol + 8H₂O
- la catalase (CAT) : H₂O₂ \rightarrow H₂O + ½ O₂

Ces systèmes antioxydants travaillent de concert pour réguler la production de ROS et protéger ainsi les cellules végétales contre les dommages oxydatifs. Il est important de noter que si les ROS peuvent avoir une action dommageable, ils peuvent aussi avoir un rôle de signalisation. Ceci dépend de l'équilibre délicat entre la production de ROS et la détoxification au niveau spatial et temporel (Gratao et al., 2005). Cet équilibre peut être perturbé par un certain nombre de facteurs, notamment environnementaux (Figure 10). À la suite de ces perturbations, les niveaux intracellulaires de ROS peuvent rapidement augmenter. L'augmentation rapide de la concentration des ROS correspond au « burst oxydatif ».

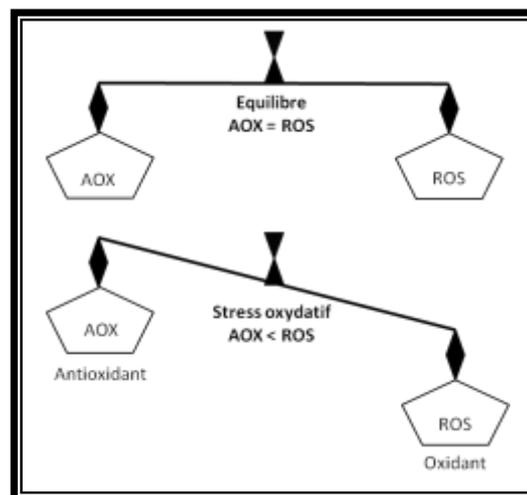


Figure 10. Equilibre entre Antioxydants (AOX) et ROS, d'après Gill & Tuteja, 2010.

1.3.1.6 Burst oxydatif : utilisation des ROS lors de la réponse aux stress

Le burst oxydatif est une réponse de défense caractéristique, intense, rapide et transitoire, qui se produit à la surface de la cellule végétale (Lamb & Dixon, 1997). C'est une réponse cellulaire commune à de nombreux stress chez les végétaux qui peuvent avoir différentes sources, selon, notamment, qu'il s'agisse d'un stress d'origine biotique ou abiotique. L'accumulation de ROS initie la peroxydation lipidique, l'oxydation des acides nucléiques mais aussi des protéines et *in fine*, peut

causer des dysfonctionnements cellulaires notamment en provoquant la mort cellulaire. Parmi les ROS, l' H_2O_2 a été la molécule la plus étudiée lors du burst oxydatif. En effet, l' H_2O_2 a une durée de vie et une distance de diffusion importante, comparée aux autres ROS. Il peut donc se propager vers des cibles distantes et initier des oxydations biologiques. Plusieurs mécanismes peuvent générer l' H_2O_2 , comme les peroxydases pariétales (Bolwell et al., 1999), mais aussi la NADPH-oxydase de la membrane plasmique qui catalyse la réduction de l' O_2 en $\text{O}_2^{\bullet-}$ en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons. L'anion superoxyde est ensuite rapidement transformé en H_2O_2 par une superoxyde dismutase (SOD). Des ont montrées que l' O_3 provoque un burst oxydatif et induit des réponses semblables à celles observées lors de la réaction d'hypersensibilité (HR) induites lors d'interactions incompatibles (Kangasjarvi et al., 2005; Overmyer et al., 2005). Il s'agit notamment de l'induction du métabolisme oxydatif, de la synthèse de composés phénoliques, de l'expression de gènes de défense tels que le gène PR (*pathogenesis-related protein*), la Phenyl-amonia lyase (PAL) ou la glutathion S-transférase (GST) mais également l'induction de résistances locales et systémique induite par les agents pathogènes (Kangasjarvi et al., 1994; Rao & Davis, 2001; Langebartels et al., 2002).

1.3.1.7 Le burst oxydatif induit par l' O_3

La mort cellulaire induite par l' O_3 est considérée comme le résultat des effets délétères des ROS issus de la dégradation de l' O_3 dans l'apoplaste (Ahlfors et al., 2004) mais aussi par le burst oxydatif endogène. La production de l'oxygène singulet est exacerbée lors d'un stress ozone chez *Arabidopsis* (Kanofsky & Sima, 1991). Il peut avoir soit un rôle toxique en induisant des dommages oxydatifs conduisant à une mort par cytotoxicité soit, avoir un rôle de signalisation en activant différentes voies se manifestant par un changement d'expression des gènes et participer ainsi à la mort cellulaire programmée (Kim et al., 2008). Ainsi, chez le mutant conditionnel *flu* qui surproduit l' $^1\text{O}_2$ à la lumière, il est le principal ROS impliqué dans les dommages foliaires (op den Camp et al., 2003; Wagner et al., 2004). Aussi, l' $^1\text{O}_2$ peut réagir avec l'ascorbate conduisant à la formation d' H_2O_2 et de DHA (Kramarenko et al., 2006). Par ailleurs, l'implication de la NADPH oxydase de la membrane plasmique lors de l'accumulation de ROS induite par l'ozone, a été montré dans le mutant d'*Arabidopsis thaliana* RCD1 (*radical-induced cell death1*; (Overmyer et al., 2000)). Dans ce travail, l'application du diphényliodonium (DPI), un inhibiteur de la NADPH oxydase, inhibe l'accumulation de ROS. La réduction des dégâts sur les feuilles du mutant RCD1 indique que l'ozone active la production de $\text{O}_2^{\bullet-}$ cellulaire (Overmyer et al., 2000).

Comme illustré dans la figure 11, les ROS n'agissent pas seuls mais peuvent interagir et se combiner à de nombreux acteurs de voies de signalisation comme le calcium, les kinases et le monoxyde d'azote entre autres, lors des différentes phases de la réponse à l'ozone. Ces différents acteurs seront détaillés dans les sections suivantes.

Figure 3 de Rao et al. 2000
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199393>

Figure 11. Modèle simplifié identifiant les diverses composantes de signalisation. D'après (Rao et al., 2000), Figure 3.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199393>

Ils peuvent agir soit en concert ou de manière antagoniste et influencer les réactions de défense des plantes et la PCD, en réponse à une grande variété de stimuli qui génèrent des ROS. Différents facteurs de stress sont connus pour agir en générant des espèces activées d'oxygène telles que $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 qui oxydent les lipides. Ces ROS induisent des changements sur les propriétés physico-chimiques de la membrane plasmique et sont connus pour modifier les activités phospholipases en modifiant les flux ioniques, les canaux Ca^{2+} , les GTPases, les MAP kinases, etc.... Ces modifications vont à leur tour activer la biosynthèse d'autres molécules de signalisation comme le NO, l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), l'éthylène et /ou d'autres phytohormones. Ces molécules signal vont agir ensemble pour amplifier le signal et modifier l'état redox cellulaire provoquant la transcription des gènes de défense et de l'induction de la mort cellulaire.

1.3.2 Le monoxyde d'azote (NO)

1.3.2.1 Généralités

Le monoxyde d'azote est un gaz diatomique impliqué dans de nombreux processus physiologiques dans le monde animal, incluant notamment les phénomènes de neurotransmission, d'agrégation plaquettaire, de relaxation musculaire et la réponse immunitaire. La découverte de la production de NO par les plantes lors de l'exposition aux agents pathogènes (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998) a suscité un intérêt croissant comme en témoigne de nombreuses études. Il est maintenant de plus en plus évident que le NO joue un rôle clé dans certains processus physiologiques chez les plantes en tant que molécule de signalisation (Wilson et al., 2008). En effet, il est impliqué dans la croissance, la fermeture des stomates et la germination, la maturation des fruits et fleurs et la résistance aux pathogènes (Beligni & Lamattina, 2000; He et al., 2004; Villarreal et al., 2009). Le NO est également généré en réponse à des facteurs abiotiques comme la sécheresse, la salinité ou l'ozone (Wilkinson et al., 2007; Neill et al., 2008).

Plusieurs voies de biosynthèse peuvent expliquer la production de NO. Le NO a d'abord été caractérisé comme un produit biologique issu de la réduction des nitrites par les bactéries dénitrifiantes. À la fin des années 80, la NO synthase (NOS) a été isolée chez les mammifères, et il a été montré que les animaux peuvent oxyder l'arginine en NO. Plus récemment, il est devenu clair que la réduction du nitrite en NO se produit également chez les plantes, en particulier dans des conditions hypoxiques lorsque l'oxydation arginine devient moins efficace (Gladwin et al., 2005). Bien qu'il y ait une quantité croissante de données démontrant l'importance du NO chez les plantes, notre compréhension de sa biosynthèse et de son implication dans différentes voies de signalisation a du retard par rapport au monde animal. De nombreux travaux dans la littérature chez les plantes

plaident en faveur de la présence des deux voies de formation : la réduction du nitrite et le fonctionnement d'une NOS dépendante de l'arginine (Figure 12). Cependant, l'identité des acteurs et l'importance des processus de chaque voie de biosynthèse en fonction de l'état physiologique restent encore un sujet de débat.

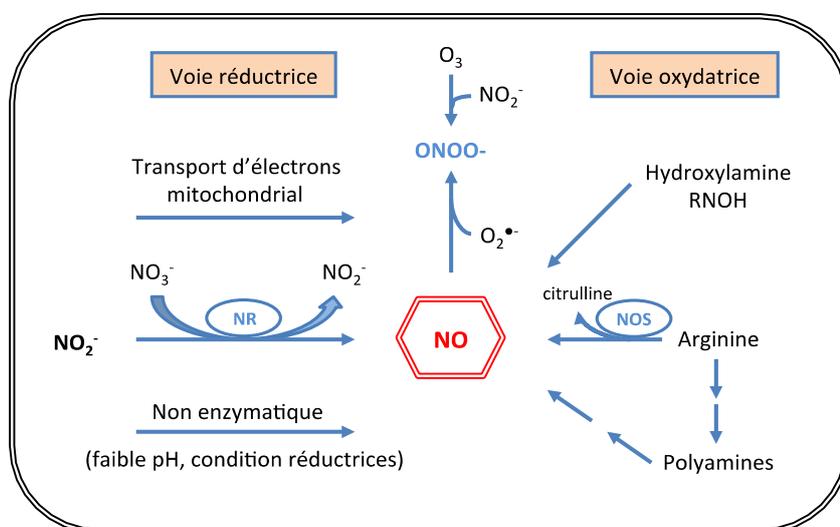


Figure 12. Deux grandes voies de formation de NO dans les plantes. Schéma modifié d'après Moreau et al. (2010).

L'électron nécessaire pour réduire les nitrites (NO_2^-) en NO peut être fourni par le système de transport d'électrons mitochondrial, par le NAD(P)H dans la nitratre réductase (NR) ou dans un environnement réducteur acide. Il existe aussi des études, arguant de l'existence d'une voie oxydative permettant la synthèse de NO chez les plantes. Plusieurs substrats sont proposés tels que l'arginine, des polyamines et les hydroxylamines mais aucune enzyme a été identifiée à ce jour.

1.3.2.2 Rôles du NO dans la réponse à l'ozone

Le rôle du NO dans la mort cellulaire induite par l' O_3 n'est pas encore bien compris. L' O_3 induit rapidement une production transitoire de NO dans les feuilles chez *Arabidopsis*, principalement dans les régions où se localisent les lésions. Le NO est aussi produit en réponse à l' O_3 sur le tabac où il induit la transcription d'enzymes tels que l'AOX, la GPX et la PAL de manière dépendante de la GMPc (Pasqualini et al., 2008). Par ailleurs, l'induction de l'alternative oxydase, AOX1a, par l' O_3 peut être bloquée par un piège à NO et un inhibiteur de la NO synthase (Ederli et al., 2006). Le rôle du NO en réponse à l' O_3 , a été renforcé par l'utilisation de différents mutants ayant des niveaux altérés de production de NO. De même, Ahlfors et al. (2009), en utilisant un donneur de NO, ont montré que le NO peut modifier la biosynthèse des hormones et l'expression des gènes chez *A. thaliana* lors de l'exposition à l' O_3 . La production fonctionnelle de NO est nécessaire pour la réponse à l' O_3 . Ainsi, le mutant RCD1 qui est résistant à l' O_3 s'est avéré être un surproducteur de NO; en revanche, *Atnoa1/rif1* (*Arabidopsis nitric oxide associated 1/resistant to inhibition by FSM1*), un mutant avec une production diminuée en NO, est hypersensible à l' O_3 (Ahlfors et al., 2009).

Dans l'environnement mitochondrial, le NO peut réagir avec l'anion superoxyde pour former du peroxyde nitrite ONOO^- et sa forme protonnée, l'acide peroxyde nitreux (ONOOH) (Pryor et al., 2006; Wilson et al., 2008). Ce dernier peut aussi être directement formé suite à la réaction entre

l' O_3 et le nitrite (NO_2^-) (Naumov et al., 2010). Le peroxy-nitrite est impliqué dans de nombreuses réactions telles que l'oxydation de thiols, l'initiation de la peroxydation lipidique et à la nitration des tyrosines, mais il peut être pris en charge par le monohydroascorbate (Kurz et al., 2003). Il a également été suggéré que l'interaction entre l'ascorbate localisée dans les mitochondries et l'anion superoxyde peut déplacer l'équilibre de la réaction vers la formation de NO (Barone et al., 2003). Enfin, le NO est également connu pour être un élément des cascades de signalisation cellulaire en participant à l'induction d'une HR qui résulterait de l'action concertée entre le NO et H_2O_2 et serait activée lorsqu'un rapport précis entre NO et H_2O_2 est atteint. Le NO est donc certainement une molécule de signalisation importante dans la réponse à l' O_3 .

1.3.3 Le calcium

1.3.3.1 Généralités

Le calcium (Ca^{2+}) est un ion divalent qui est au cœur d'un réseau de voies de signalisation sophistiquées. Ces voies intègrent des informations provenant de stress biotiques et abiotiques qui ont un impact sur l'expression des gènes et la physiologie cellulaire. Un événement clé dans le processus de signalisation est la conversion d'un stimulus dans un langage compréhensible par la machinerie cellulaire. Dans ce contexte, une étape cruciale est la génération de seconds messagers (Berridge et al., 2003), qui contrôle en aval des événements en activant ou en inhibant une large gamme de réactions biochimiques. Le Ca^{2+} joue ce rôle de messenger secondaire et est ubiquitaire. La concentration en Ca^{2+} libre du cytoplasme ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) est normalement maintenue très basse par la cellule (de l'ordre de quelques nM) car sinon toxique. Il est donc activement rejeté à l'extérieur ou stocké dans divers compartiments cellulaires. Un fort gradient de concentration est donc maintenu entre le cytosol/extérieur et cytosol/compartiments cellulaires. Lors d'un stress, la concentration en Ca^{2+} libre du cytoplasme va varier transitoirement. Cette variation du $[Ca^{2+}]_{cyt}$ peut être la résultante soit d'une entrée de Ca^{2+} d'origine apoplasmique, via l'activation de canaux calciques de la membrane plasmique, soit d'une libération du Ca^{2+} des réserves internes (vacuole ou réticulum endoplasmique) (Knight et al., 1996). Lors d'un stimulus, le $[Ca^{2+}]_{cyt}$ augmente dans les cellules végétales souvent sous forme d'oscillations répétitives ou de pic de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ où la fréquence, l'amplitude et la forme de l'augmentation de Ca^{2+} sont déterminées par la nature du stimulus. Cette hétérogénéité de l'activité en calcium cytosolique en termes de durée, d'amplitude, de fréquence et de la répartition spatiale ont conduit Hetherington et ses collaborateurs à formuler le concept de « signatures calciques » (Webb et al., 1996). Ainsi, l'information du signal serait codée par une signature Ca^{2+} spécifique qui est définie par un contrôle précis des paramètres spatiaux, temporels, et des modifications dans la $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Cela permet à ces variations calciques d'être impliquées dans de nombreuses voies de transduction de signaux. Bien que la forme et la distribution spatio-temporelle de l'élévation Ca^{2+} cytosolique libre puissent être d'une importance critique pour la réponse couplée à un stimulus (Allen et al., 2001), un niveau supplémentaire de régulation et de spécificité est réalisé

par des protéines de liaison au Ca^{2+} qui fonctionnent comme des protéines réceptrices (Batistic & Kudla, 2004). Ces protéines décodent et relayent l'information codée par la signature Ca^{2+} vers des interactions protéine-protéine spécifiques, des cascades de phosphorylation définies, ou des réponses transcriptionnelles (Luan et al., 2002; Sanders et al., 2002; Finkler et al., 2007). Par conséquent, les interactions dynamiques entre les signatures calciques et les protéines « sensing » contribuent à la spécificité de la signalisation Ca^{2+} selon le stimulus.

L'utilisation de sondes à calcium à base de protéines et en particulier la technologie recombinante de la protéine aequorine cytosolique et nucléaire (Knight et al., 1991; Nakajimashimada et al., 1991) a permis d'obtenir de très nombreuses données. Ainsi, récemment, des changements de concentration calcique dans le compartiment nucléaire en réponse à des stimuli externes (froid), ont été signalés pour la première fois sur des cellules en suspensions de tabac (*Nicotiana plumbaginifolia*) (van der Luit et al., 1999; Pauly et al., 2000). De même Pauly et al. (2001), ont montré cette variation nucléaire lors d'un choc hyperosmotique et son indépendance de celle du cytoplasme. Plusieurs études laissent à penser que l'activité calcique nucléaire serait autonome et indépendante du calcium cytosolique (O'Malley et al., 2003; Wang & Sihra, 2004; Kumar et al., 2008; Mazars et al., 2008) et qu'il pourrait participer à la régulation enzymatique (Gleason et al., 2006) et génique (van der Luit et al., 1999; Galon et al., 2008) au niveau du noyau. Des variations de peroxyde d'hydrogène et d'oxyde nitrique, ont été localisées dans le noyau (Ashtamker et al., 2007) suggérant la possibilité d'interférences avec le calcium.

1.3.3.2 Variation calcique en réponse à l'ozone

Lors d'une exposition à l'ozone, le Ca^{2+} joue un rôle de premier ordre (Clayton et al., 1999; Evans et al., 2005; Kadono et al., 2006). Des influx très précoces de Ca^{2+} s'observent dans des feuilles d'*A. thaliana* exposé à l' O_3 par l'activation de canaux Ca^{2+} redox-sensibles (Clayton et al., 1999; McAinsh et al., 2002). L'utilisation de chélateurs de Ca^{2+} et d'inhibiteurs de canaux calciques a permis de démontrer que des influx de Ca^{2+} sont nécessaires à l'activation de multiples réponses induites par l' O_3 , comme l'activation de MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (Agrawal et al., 2002), la production de ROS (Kangasjarvi et al., 2005), l'activation de gènes de défense (Ludwikow et al., 2009; Wrzaczek et al., 2010) ou la mort cellulaire programmée (Overmyer et al., 2005). La durée du signal est contrôlée par les pompes à Ca^{2+} au niveau du réticulum endoplasmique par exemple, et par l'induction de protéine de liaison au calcium (Agrawal et al., 2002). Cette élévation du Ca^{2+} cytosolique cause alors des changements rapides du profil de phosphorylation des protéines (Agrawal et al., 2002; Rakwal & Komatsu, 2004) et induit la synthèse d'une enzyme antioxydante, la glutathione-S-transférase (Clayton et al., 1999). Jusqu'à présent, aucune donnée concernant les variations calciques nucléaires en réponse à l' O_3 n'est disponible dans la littérature.

1.3.4 Les protéines kinases

Les processus de phosphorylation et déphosphorylation de protéines sont des mécanismes de première importance dans la transduction de signaux. Ainsi, environ un millier de gènes codant des protéines kinases et environ 200 gènes codant des protéines phosphatases sont présents dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (*The Arabidopsis genome initiative, 2000; Tena et al., 2001*). Les premières études ayant montré le rôle clef des protéines kinases, dans les voies de signalisation conduisant à la mise en place des réactions de défense, sont des approches pharmacologiques en utilisant des inhibiteurs de l'activité de ces protéines. Il a été montré que les inhibiteurs de protéines kinases bloquent divers événements impliqués dans les réponses de défense tels que : l'influx de Ca^{2+} (Nurnberger et al., 1994; Tavernier et al., 1995; Jabs et al., 1996), la production de ROS (Viard et al., 1994; Lecourieux-Ouaked et al., 2000) la production d'éthylène ou l'activation de gènes de défense (Grosskopf et al., 1990). En parallèle, l'utilisation de phosphatases confirme l'implication de ces événements dans les réponses de défense (Felix et al., 1994; Lecourieux-Ouaked et al., 2000).

Chez tous les eucaryotes, les cascades d'activation d'un type de kinase, les MAPK, sont très conservées et tiennent une place importante dans le système de transduction du signal. Leur importance pour les plantes est également bien connue (Jonak et al., 2002; Baier et al., 2005). La structure universelle de ce module de signalisation se compose généralement de trois protéines fonctionnellement liées : une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) qui phosphoryle une MAP kinase kinase (MAPKK) qui à son tour phosphoryle une MAP kinase (MAPK). Cette dernière étant responsable de l'activation par phosphorylation de protéines spécifiques, effectrices de réponses cellulaires. Les travaux mettant en évidence l'implication de MAPK dans les réponses de défense sont nombreux et d'une façon générale, l'expression constitutive ou transitoire de certaines MAPK induit l'activation de gènes de défense (Yang et al., 2001) et augmente la résistance des plantes aux pathogènes (Asai et al., 2002). A l'opposé, il a récemment été montré que des MAPK appartenant à des cascades qui ne seraient pas directement impliquées dans les réponses de défense pourraient jouer le rôle de régulateurs négatifs. Par exemple, chez *A. thaliana*, l'inactivation du gène codant MPK4 provoque l'élévation de la concentration en acide salicylique (SA), l'expression constitutive des gènes *PR* de défense et une résistance accrue aux pathogènes (Petersen et al., 2000). Une autre étude montre qu'une mutation inactivant la MAPK EDR1 rend *A. thaliana* plus résistante au mildiou et à *Pseudomonas syringae* (Tang & Innes, 2002).

1.3.4.1 Rôle en réponse à l'ozone

Sur les 20 MAPK que compte le génome d'*Arabidopsis* (MAPK Group 2002), les deux principales liées au stress oxydatif sont AtMPK6 et AtMPK3. Elles sont, avec leurs orthologues chez le tabac SIPK (*Salicylate Induced Protein Kinase*) et WIPK (*Wound Induced Protein Kinase*), induites entre autres, par l'ozone (Samuel et al., 2000; Samuel & Ellis, 2002; Ahlfors et al., 2004; Joo et al., 2005).

AtMPK6/SIPK et AtMPK3/WIPK sont également activées par le H_2O_2 et le $O_2^{\bullet -}$ (Kovtun et al., 2000; Samuel et al., 2000; Moon et al., 2003). En plus d'être régulées par les ROS, l'activation des AtMPK6 et AtMPK3 par des formes constitutivement actives en amont MAPKK AtMKK4 et AtMKK5, induisent une production endogène de H_2O_2 et la mort cellulaire (Ren et al., 2002).

Bien que les deux AtMPK6 et AtMPK3 soient rapidement activés par l' O_3 , la régulation de leur activité par celui-ci est différente. AtMPK3 est régulée après exposition à l' O_3 au niveau de la transcription, la traduction ainsi qu'au niveau post-traductionnelles, alors que seule, l'activation post-traductionnelle de l'activité kinase de AtMPK6 a été détectée (Ahlfors et al., 2004). Par ailleurs, l'activation de AtMPK3 semble durer plus longtemps que celle de AtMPK6. La sensibilité à l'ozone des végétaux et l'expression des gènes antioxydants sont liées par ces classes de kinases, puisque la répression et la surexpression de la SIPK chez le tabac (l'orthologue AtMPK6) conduit à une augmentation de la sensibilité à l' O_3 due à des changements dans l'expression de l'APX et de la GPX (Samuel & Ellis, 2002). Aussi, chez le tabac, la SIPK semble également réguler l'activité des WIPK (l'orthologue AtMPK3), puisque chez la lignée surexprimant le gène SIPK, l'activité induite par l' O_3 de WIPK était significativement réduite, alors que l'inverse était vrai pour la lignée réprimant SIPK (Samuel & Ellis, 2002). Le rôle et la fonction de ces MAP kinases dans les plantes exposées à l' O_3 sont cependant encore mal connus, mais des données récentes montrent qu'elles pourraient être reliées aux réponses hormonales, comme décrites ci-dessous.

1.3.5 Les Hormones (ABA, ET, SA, JA)

Les hormones végétales jouent un rôle clé lors d'une exposition à l'ozone en contrôlant la réponse et le développement des lésions. L'acide salicylique (SA), l'éthylène (ET) et l'acide jasmonique (JA) sont des seconds messagers dans la transduction du signal oxydatif (Watanabe et al., 2001). Ces hormones régulent l'intensité du signal primaire en déclenchant des cascades MAPK (Agrawal et al., 2002; Agrawal et al., 2003; Guo & Ecker, 2004) et sont importants pour déterminer le degré de sensibilité de la plante et l'initiation de la lésion induite par l'ozone, sa propagation et son confinement (Overmyer et al., 2003). La régulation de l'induction et la propagation des symptômes lors de stress oxydatif par les phytohormones ET, SA et JA, ont été rapportés dans plusieurs études (Moeder et al., 2002; Rao et al., 2002; Vahala et al., 2003). Ces phytohormones en tant que molécules signal induisent d'autres changements moléculaires et physiologiques chez les plantes exposées à l' O_3 (Overmyer et al., 2003; Tamaoki, 2008).

L'éthylène est impliqué dans la régulation des réponses des plantes à la fois lors de stress biotiques et abiotiques, en plus de ses fonctions dans la croissance des plantes et le développement (van Doorn & Woltering, 2008). La production d'ET induite par l' O_3 chez les plantes a été signalée par Craker (1973). Depuis lors, de nombreuses études ont montré que l'ET joue un rôle clé dans le développement des lésions foliaires induite par l' O_3 (Tingey et al., 1976; Mehlhorn & Wellburn, 1987). En outre, différentes études de mutants ou des plantes transgéniques déficientes dans la

biosynthèse ou la signalisation de l'ET ont indiqué que la production d'ET induite par l'O₃ accélère la PCD comme la production de ROS (Nakajima et al., 2002; Overmyer et al., 2003).

L'acide salicylique est une phytohormone qui peut induire la résistance des plantes aux pathogènes (White, 1979). Il a d'abord montré que le SA était synthétisé à partir de la phénylalanine et l'acide benzoïque dans le tabac (*Nicotiana tabacum*), la pommes de terre (*Solanum tuberosum*) et *Arabidopsis thaliana* (Coquoz et al., 1998; Mauch-Mani & Metraux, 1998; Ogawa et al., 2005). Toutefois, Wildermuth et ses collaborateurs (2001) ont découvert une autre voie de biosynthèse de SA chez *Arabidopsis* infecté par un pathogène, à partir du chorismate lui même produit par l'isochorismate. Le SA renforce la réaction hypersensible qui protège la plante contre la propagation de l'agent pathogène (Cao et al., 1994). Dans ce processus, SA induit une PCD dans les cellules infectées avant que le pathogène ne puisse se propager aux cellules adjacentes. La biosynthèse de SA est connue pour être induite lors d'une exposition à l'ozone, et provoque également la PCD sur les feuilles (Ernst et al., 1992; Yalpani et al., 1994). Par ailleurs, l'analyse du mutant *npr1* (pour *Nonexpresser of PR genes*) et la lignée NahG, qui sont altérées dans la signalisation SA, a révélé que la production d'ET induite par l'O₃ dépend de SA (Rao et al., 2002).

Sans un système régulateur de confinement qui limite la propagation de la lésion une fois qu'elle est lancée, l'induction de la mort cellulaire se traduirait par une destruction progressive de l'organe entier. Cela est évident, par exemple, dans le mutant d'*Arabidopsis lsd1* (pour *Lysine-specific demethylase 1*) (Jabs et al., 1996), où la mort cellulaire « s'emballe » et se répand dans toute la feuille une fois que la lésion est initiée. Deux différents mécanismes hormonaux peuvent être proposés comme responsable pour l'endiguement de la propagation des lésions. Le premier mécanisme se fait par l'intermédiaire du JA et son ester méthylique, le méthyl-jasmonate (MeJA). Ces molécules dérivées de l'acide linoléique aussi appelées oxylipines, sont très étudiées chez les plantes (Farmer et al., 1998). L'exposition à l'ozone stimule la biosynthèse de JA dans les plantes (Rao et al., 2000; Tuominen et al., 2004). Dans le cycle oxydatif de la mort cellulaire (Figure 13), JA protège les tissus des ROS induits par les cellules et ainsi contre les effets de SA et de l'ET. Les mutants d'*Arabidopsis oji1* (*ozone-sensitive and jasmonate-insensitive 1*) et *rcd1* décrits comme sensibles à l'O₃, se sont effectivement révélés être JA insensible (Koch et al., 2000; Overmyer et al., 2000; Rao et al., 2000; Tamaoki et al., 2003). Chez le mutant d'*Arabidopsis rcd1*, par exemple, l'ET exogène promeut la mort cellulaire dépendante de l'anion superoxyde, alors que l'application exogène du MeJA inhibe sa propagation. Toutefois, le JA ainsi que l'ET, sont impliqués dans de confinement de la lésion (Overmyer et al. 2000). Basé sur des études de mutants O₃-sensible et JA-insensible (*jar1*), O₃-tolérants et ET-insensible (EIN2), Tuominen et ses collaborateurs (2004) ont émis l'hypothèse que l'accumulation rapide de l'éthylène stimule la propagation de la mort cellulaire et supprime la protection par JA. L'accumulation tardive de JA, cependant, inhibe la voie de l'éthylène et la propagation de la mort cellulaire. Par ailleurs, de nombreuses études ont montrées que la formation des lésions induite par l'O₃ sur les feuilles est renforcée par l'ET ou le SA mais d'autres études, démontrent que ET et SA peuvent protéger les feuilles des dommages induite par l'O₃. Ainsi, un prétraitement avec de l'éthylène, de haricots mungo (*Vigna radiata*) ou de pois (*Pisum sativum*)

exposés à l' O_3 , réduit l'ampleur des lésions foliaires par rapport aux plantes non traitées (Mehlhorn, 1990). En outre, Vahala et ses collaborateurs (2003) ont suggérés que la signalisation ET joue un double rôle, en inhibant ou stimulant la PCD, en fonction de l'intensité du stress à l' O_3 . De même, Rao et Davis (1999) ont démontré que SA est nécessaire pour maintenir l'état redox cellulaire et potentialiser les réactions de défense dans les plantes exposés à l' O_3 , mais que des niveaux élevés de SA stimulent la production de ROS initiant ainsi la PCD. Chez les mutants déficient dans la voie, soit, de signalisation ET (EIN2; (Alonso et al., 1999)) soit, de biosynthèse de l'acide salicylique (*sid2*; (Wildermuth et al., 2001)), l'expression des gènes liés aux systèmes antioxydants est réduite. Les effets de ET et SA jouent un rôle important dans la protection des plantes contre les dommages par l'ozone, et ce processus est réalisé en partie grâce à l'activation des voies de biosynthèse du glutathion dépendante de ces derniers (Yoshida et al., 2009).

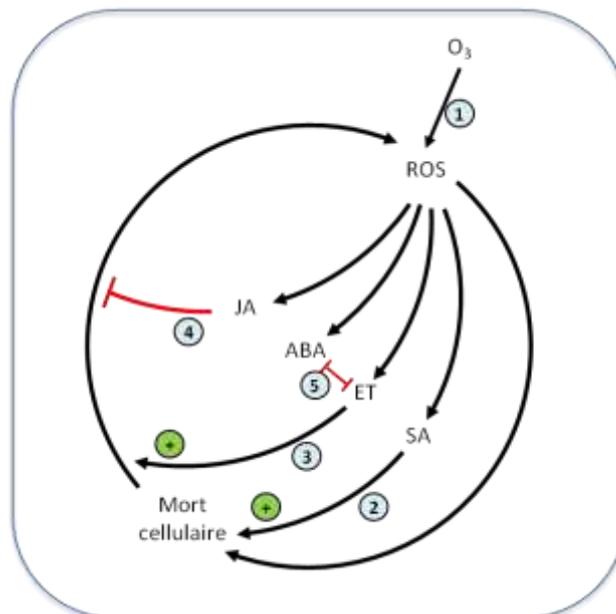


Figure 13. Le cycle oxydatif de la mort cellulaire.

Les produits de dégradation de l'ozone (O_3) induisent la génération endogène d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (1) résultant à l'accumulation de l'acide salicylique (SA) et la mort cellulaire programmée (PCD) (2). L'initiation de la mort cellulaire provoque la biosynthèse de l'éthylène (ET) nécessaire pour prolonger la génération de ROS et permettant la propagation de celle-ci (3). L'acide jasmonique (JA) contre alors la progression du cycle par antagonisme des fonctions de SA/ET favorisant la mort cellulaire (4). L'acide abscisique (ABA) antagonise le signal ET (5).

D'après Overmyer et al., 2003 ; Kangasjarvi, et al., 2005.

Concernant l'ABA, on sait que les protéines phosphatases 2C (PP2C) : ABI1 et ABI2 antagonistes de l'ABA sont inhibées par H_2O_2 (Meinhard & Grill, 2001; Meinhard et al., 2002). Par conséquent, lors du stress oxydatif par l' O_3 , le signal l'ABA initié par les MAPK est renforcé. La signalisation ABA conduisant à la génération d' H_2O_2 (Jiang et al., 2003), la sensibilité redox de PP2C amplifie de manière exponentielle le signal primaire. Dans ce contexte, il convient de noter que plusieurs gènes ABA-sensibles sont activés dans le mutant *Arabidopsis vtc1* (Pastori et al., 2003), qui a seulement 30% du pool d'ascorbate comparé au type sauvage. Cette observation indique que le seuil de la régulation redox par l'ABA est faible. Un site d'initiation putatif pour l'induction du signal

ABA est le cycle de la violaxanthine. La faible disponibilité de la forme réduite d'ascorbate déséquilibre la réaction à l'état époxyde (Neubauer & Yamamoto, 1994) favorisant ainsi la biosynthèse du précurseur de l'ABA : la xanthoxine (Marin et al., 1996). L'ABA joue également un rôle antagoniste de l'ET dans de nombreuses réponses physiologiques comme dans l'ouverture/fermeture des stomates (Atkinson et al., 1989), dans la germination (Ghassemian et al., 2000), mais aussi en réponse à l'O₃ (Overmyer et al., 2008; Wilkinson & Davies, 2009). Des analyses de transcriptome sur *Medicago truncatula* ont montré une induction des gènes liés à l'auxine et aux cytokinines en réponse à l'O₃ (Puckette et al., 2009).

Les trois processus qui déterminent la formation des lésions sont donc le contrôle stomatique, les systèmes antioxydants apoplastiques, et la perception des ROS (initiation, la propagation et le confinement de la lésion). Ils peuvent être décrits comme une boucle d'auto-amplification appelé cycle oxydatif de la mort cellulaire (Figure 13) (Van Camp et al., 1998; Overmyer et al., 2000; Overmyer et al., 2003). Dans ce cycle « endogène », la mort cellulaire par l'intermédiaire de la production de ROS déclenchée par l'O₃ est éthylène-dépendante (Overmyer et al., 2000; Moeder et al., 2002; Wohlgenuth et al., 2002; Kanna et al., 2003). Cette production de ROS entraîne une mort cellulaire SA-dépendante (Orvar & Ellis, 1997; Rao & Davis, 1999), qui continue jusqu'à ce que la troisième composante, le JA, antagoniste de la propagation de la lésion, contienne la lésion. Quant à l'ABA, son rôle généralement antagoniste à l'ET (Tanaka et al., 2005, 2006) est également observé en réponse à l'O₃ (Overmyer et al., 2008; Wilkinson & Davies, 2009).

1.3.6 Ozone et PCD

La PCD est une partie intégrante du développement des plantes et des réponses aux stress abiotiques ou biotiques. Le développement de cette mort est un processus génétiquement contrôlé et nécessite en général, l'induction de gènes spécifiques pour permettre l'activation de la machinerie cellulaire aboutissant à sa propre destruction. La mise en route de ce processus est déterminée par l'information que la plante reçoit d'un certain nombre de sources, comprenant son environnement, son stade de développement et de l'évaluation de son état métabolique (Williams et al., 1992). La cellule doit évaluer ces différents facteurs externes et internes et agir en fonction, soit en différenciant, se divisant ou en mourant. La PCD est conservée chez tous les eucaryotes et la forme la mieux décrite et documentée, à ce jour reste l'apoptose animale. Cependant, ce suicide cellulaire chez les plantes a été très étudié ces dernières décennies et, a permis à van Doorn et ses collaborateurs (2011) de définir une nouvelle classification.

La génération des lésions foliaires visibles par l'ozone tend à se produire au moyen de deux processus. Tout d'abord, l'ozone et les ROS induites chez les plantes sont directement préjudiciables aux cellules, entraînant une nécrose de la feuille ou la chlorose (Mudd et al., 1996). Deuxièmement, les ROS provenant de la « dégradation » de l'O₃ en tant que molécules signal stimulent la PCD (Overmyer et al., 2005). Sur la base des différents éléments de signalisation passés en revue ci-

dessus, la séquence d'événements représentés sur Figure 14, a été proposée par Kangasjärvi et al. (2005) chez les plantes exposées à l'O₃.

L'O₃ entrant dans les plantes par les stomates, les cellules de garde sont touchées en premier. L'O₃ se dégrade sous forme de ROS dans l'apoplaste des cellules de garde induisant la fermeture des stomates (et/ou l'inhibition de l'ouverture) notamment en modifiant l'activité des canaux ioniques responsables de la fermeture stomatique (Torsethaugen et al., 1999; Vahisalu et al., 2008). La diminution de la conductance stomatique constitue la première ligne de défense de la plante. Le pool d'ascorbate apoplastique et les enzymes associés à son recyclage sont la deuxième barrière de défense aux ROS produits, et jouent un rôle primordial dans la prise en charge de ces derniers. Mais lors d'une forte exposition à l'O₃, la quantité de molécules oxydantes est supérieure à la capacité antioxydante apoplastique. Cela provoque au niveau apoplastique une augmentation des ROS jusqu'à un seuil qui déclenche plusieurs réponses (numéros 1 à 11 dans la Figure 14).

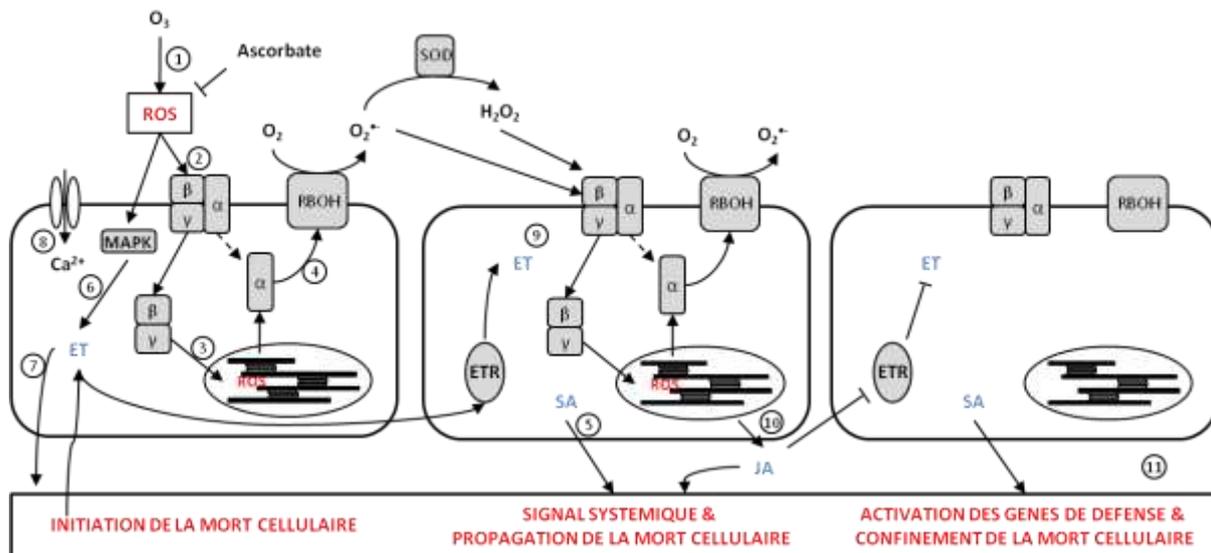


Figure 14. La transduction du signal et sa propagation spatiale induite en réponse à une exposition à l'O₃. Schéma modifié d'après Kangasjärvi et al. (2005).

L'O₃ est dégradé en ROS dans l'apoplaste (1). Leur accumulation est affectée par des systèmes antioxydants tels que l'ascorbate. Les ROS apoplastiques activent des voies de signalisation dépendant de protéines G hétérotrimériques (2). La première phase de transduction du signal est dépendante des sous-unités βγ et induit la génération de ROS au niveau des chloroplastes (3). Cette génération de ROS chloroplastiques active à son tour la NADPH oxydase (RBOH) de la membrane plasmique avec la complicité de la sous-unité α des protéines G (4). En parallèle, des cascades MAP kinases sont activées (6). Elles régulent alors positivement la biosynthèse d'éthylène (ET) (7). Conjointement à l'ET, la biosynthèse d'acide salicylique (SA) est induite (5). Un influx de calcium est induit de manière précoce dans la transduction du signal (8) comme l'activation des MAP kinases et de la NADPH oxydase sont toutes les deux dépendantes du calcium. La génération de ROS par la NADPH oxydase est essentielle pour la propagation du signal induit par l'O₃. Les protéines G sont une fois de plus impliquées dans la transduction du signal de manière dépendant de l'ET (9). Lorsque la propagation du signal induit par l'O₃ est arrêtée, la biosynthèse de l'acide jasmonique (JA) est activée et bloque ainsi la signalisation ET, plus particulièrement sa perception (10). Ces processus régulent différentes réponses induites par l'O₃ telles que la mort cellulaire et la transcription des gènes de défense (11).

Au moins deux chaînes d'événements distinctes sont induites. Tout d'abord, l'O₃ induit une production de ROS dans les chloroplastes des cellules à travers la protéine G hétérotrimérique (ou le complexe Gβγ) (numéros 2 et 3). Ensuite, une production secondaire de ROS est induite à travers l'activation de la NADPH oxydase de la membrane plasmique dépendante d'une sous-unité d'une protéine G (numéro 4). La production de ROS et l'initiation de la mort cellulaire dépendrait de SA

(numéro 5), se propagerait aux cellules avoisinantes. Les cascades MAP kinases sont également activées en quelques minutes suite à l'exposition à l'O₃ (numéro 6), elles sont activées par une élévation du Ca²⁺ cytosolique (numéro 8). Ces deux évènements précoces semblent, cependant, indépendants les uns des autres car l'activation des MAP kinases a lieu chez les lignées O₃-sensibles et résistantes indépendantes d'une protéine G. Ainsi, les MAP kinases ne semblent pas être directement impliquées dans l'activation de la production de ROS par la NADPH oxydase. Cependant, l'activation de AtMPK6 (SIPK chez le tabac) est impliqué dans la phosphorylation de l'ACC synthase, ce qui entraîne une augmentation de la synthèse d'ET et (probablement) de son activation autocatalytique en augmentant la stabilité de l'ACC synthase (numéro 7) (Nakajima et al., 2002). La propagation du burst oxydatif induit par l'O₃ est activée après la perception du signal O₃ au niveau du site d'initiation de la lésion. Les ROS produits par la NADPH oxydase au site d'initiation de la lésion sont perçus par les cellules environnantes (numéro 4), dans lesquelles la production de ROS, est détectable dans plusieurs compartiments cellulaires. Que ce soit la propagation du signal aux cellules voisines, ou la capacité de celles-ci à percevoir le signal ROS, ou d'y répondre, ces évènements semblent être éthylène-dépendants (numéros 7 et 9). Ce processus répété dans le «cycle oxydatif de la mort cellulaire», se traduit par la formation de lésions visibles. Le burst oxydatif diffère en fonction de la sensibilité à l'O₃ des lignées étudiées: l'O₃ provoque un burst initial très rapide quelque soit la sensibilité. Un second burst est observé seulement chez les lignées sensibles (Kadono et al., 2006). Ce second burst, dépendant de l'éthylène et d'une protéine G, est nécessaire pour la propagation de la mort cellulaire (Figure 14).

Au cours de la propagation de la lésion, une augmentation de la concentration des produits de peroxydation lipidique membranaire est observée et sert de substrat pour la biosynthèse du jasmonate. Par conséquent, uniquement dans les lignées sensibles, une accumulation importante de JA est observée. L'accumulation de JA diminue alors la sensibilité à l'éthylène des cellules où se propage la lésion, résultant à une diminution progressive de la production (ET-dépendante) de ROS (numéro 10) et le confinement de la lésion (numéro 11). Ce processus est actif notamment par l'activation d'enzyme protéolytique comme des métacaspases (Overmyer et al., 2005) et la transcription de gènes dit de défense.

Différentes études transcriptomiques en réponse à l'O₃ sont disponibles et fournissent de nombreuses informations sur les gènes impliqués et la façon dont les plantes s'adaptent au stress O₃ (Tamaoki et al., 2003; Ahlfors et al., 2004; Gadjev et al., 2006; Li et al., 2006; Mahalingam et al., 2006; Tosti et al., 2006; Ludwikow & Sadowski, 2008; Ludwikow et al., 2009). Les profils d'expression géniques ont révélés la régulation de plusieurs centaines de gène qui peuvent être subdivisés en différents groupes : comme des gènes codant pour des facteurs de transcription, les gènes liés au métabolisme (lipidique, énergétiques, des carbohydrates...), les protéines liées à la défense et aux hormones, les molécules de signalisation, le transport et la sénescence. Ces modifications géniques induites lors d'une exposition à l'O₃ sont très similaires à celles induite lors de la réponse hypersensible du fait du burst oxydatif induit et de la mort cellulaire qui en résulte. La plasmolyse des cellules est un phénomène caractéristique de cette mort cellulaire. Bien que de nombreux travaux

concernant l'étude des voies de signalisations induites par l'O₃ soient disponibles dans la littérature, très peu concernent l'implication des canaux ioniques. Cependant, leur rôle dans les processus de plasmolyse est bien connu, et notamment lors de l'apoptose (Yu & Choi, 2000). Le peu de travaux sur le rôle des canaux ioniques, en réponse à l'O₃, ont été effectués sur leur implication dans la réponse stomatique (Torsethaugen et al., 1999; Vahisalu et al., 2008). Or, du fait de leurs positions notamment au sein de la membrane plasmique donc à l'interface entre la cellule et le milieu extracellulaire, les canaux ioniques jouent aussi un rôle central dans les voies de signalisation induites lors de stress biotiques ou abiotiques. L'importance des flux ioniques a été montrée dans les voies de signalisation amenant à la mort cellulaire chez les plantes, notamment en réponse à des pathogènes ou leurs éliciteurs (Wendehenne et al., 2002; Rebutier et al., 2005; Gauthier et al., 2007; Rebutier et al., 2007; Errakhi et al., 2008). Le rôle des canaux ioniques membranaires et leur implication lors de la mort cellulaire programmée chez les plantes sera donc décrit dans la section suivante.

1.4 Les canaux ioniques chez les plantes

Les modifications de la perméabilité de la membrane plasmique sont généralement parmi les événements les plus précocement observés suite à la perception d'un stimulus. Les canaux ioniques assurent le transfert des ions, dans le sens de leur gradient électrochimique, d'un compartiment à un autre. La probabilité d'ouverture/fermeture de ces canaux dépend de stimuli variés (ligand, variation du potentiel de membrane par exemple). Dans les contextes physiologiques, les canaux ioniques soutiennent trois fonctions fondamentales : (i) la régulation de l'osmolarité cellulaire, (ii) la transduction de signaux, en amplifiant et en propageant par exemple des signaux électriques ou en transportant des messagers secondaires, et (iii) le contrôle du potentiel membranaire. Dans les sections suivantes, je présenterai un aperçu des différentes classes de canaux ioniques présentes chez les plantes en me focalisant principalement sur les canaux de la membrane plasmique. Je décrirai comment leurs structures et leurs activités sont liées aux autres évènements de signalisation, et comment ils fonctionnent dans les plantes. Enfin, leurs rôles et leurs implications dans les voies de signalisation menant au processus de PCD seront présentés.

1.4.1 Canaux cationiques de la membrane plasmique chez les végétaux

Le potassium (K⁺) peut représenter jusqu'à 10 % du poids sec total de la plante. Il est le cation le plus abondant dans le cytosol comme il est compatible avec la structure des protéines, même à des concentrations élevées (Figure 15) (Maathuis & Amtmann, 1999; Kronzucker & Britto, 2011). La cellule utilise ce cation dans plusieurs fonctions importantes, telles que la neutralisation électrique des anions, le contrôle de la polarisation membranaire et l'osmo-régulation. Les plantes

possèdent une grande variété de systèmes de transport pour le K^+ qui répondent à différentes contraintes subies par la plante entre autres.

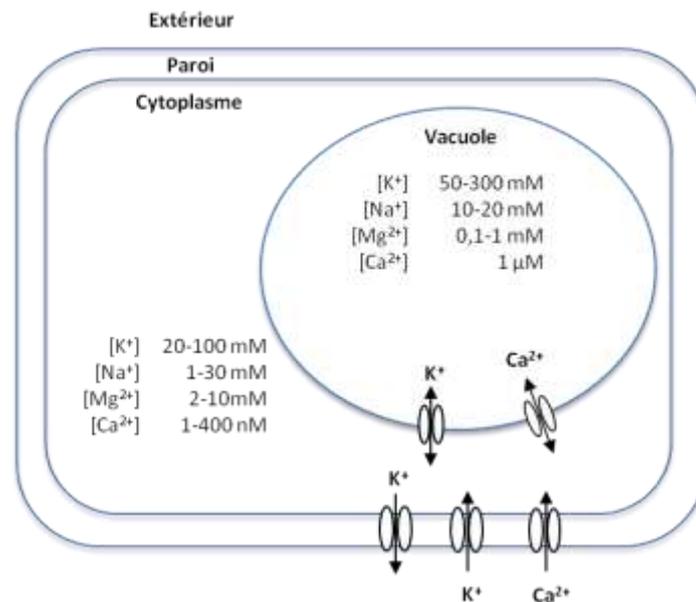


Figure 15. Répartition des principaux cations dans les cellules végétales.

D'après Maathuis & Amtmann, 1999; Karley & White, 2009; Kronzucker & Britto, 2011.

1.4.1.1 Canaux potassiques K^+

Chez les plantes, comme chez les animaux, l'activité des canaux potassiques est le déterminant majeur des propriétés électriques de la membrane cellulaire. Deux conductances perméables au K^+ , responsables de forts courants au niveau cellulaire et fortement activées de manière dépendante du voltage, ont été largement caractérisées. Elles diffèrent dans la plage de voltage dans laquelle elles sont activées. L'une est activée par hyperpolarisation de la membrane (à des potentiels plus négatifs que $E_k =$ potentiel d'équilibre thermodynamique E_i de K^+) et est donc principalement impliquée dans l'entrée de K^+ dans la cellule (Figure 16). Cette conductance entrante rectifiante est communément appelé IRC pour *Inward Rectifying Conductance* (Figure 17). L'autre conductance K^+ est activée à des potentiels de membrane plus positifs que E_k et, est donc impliquée dans l'efflux de K^+ hors de la cellule. Ce type de conductance est appelé ORC pour *Outward Rectifying Conductance* (Figure 18). Ces courants ont été observés dans quasiment tous les tissus au niveau de la membrane plasmique.

$$E_i = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[i]_{int}}{[i]_{ext}}$$

Figure 16. Equation de Nernst

Figure 1 de Véry & Sentennac, 2002
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950613>

Figure 17. Relations entre courant-voltage (I-V) illustrant les types fonctionnels de la famille des canaux K^+ rencontrés chez les plantes. D'après Véry & Sentennac, 2002.

Chez les plantes, les conductances IRC ont une forte sélectivité aux ions K^+ comparé au sodium (Na^+) et elles sont bloquées par le césium (Cs^+), le barium (Ba^{2+}) et le tétraéthylammonium (TEA). Leur activation est généralement décrite comme étant indépendante de la concentration extérieure de K^+ . La conductance ORC est caractérisée par une activation lente sigmoïdale du courant (Figure 18). En outre, la cinétique et les seuils d'activation sont K^+ -dépendante. Elle a une grande sélectivité pour les ions K^+ comparé au Na^+ et sont bloqués par le Ba^{2+} et le TEA. Chez *Arabidopsis*, la présence des ORC a été signalée au niveau des racines et des tissus foliaires. Les canaux K^+ sont des protéines multimériques. Leurs sous-unités transmembranaires, nommées sous-unités α , sont caractérisées par la présence d'un ou deux pores : domaines P. Dans la protéine fonctionnelle multimérique, quatre domaines P sont associés pour former une partie du conduit du canal, y compris son filtre de sélectivité. Un motif caractéristique GYGD/E, hautement sélectif des canaux K^+ , est présent dans les domaines P. Trois familles de sous-unités α formant les canaux sélectif au K^+ ont été identifiées chez les plantes: Shaker, TPK et Kir-like (Véry & Sentennac, 2003). Ils ont tous des homologues dans les cellules animales.

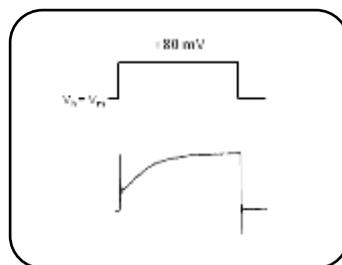


Figure 18. Schéma de la cinétique d'activation des courants K^+ de type ORC.

1.4.1.1.1 La famille des canaux Shaker

Le clonage du premier canal K^+ animal a été réalisé grâce à l'étude des mutants Shaker de drosophile. Ces mutants, nommés *shaker* présentent des mouvements saccadés des ailes, des pattes, et de l'abdomen lorsqu'ils sont anesthésiés (Kaplan & Trout, 1969). La famille Shaker chez *Arabidopsis* contient neuf gènes. Ces canaux Shaker sont composés de quatre sous-unités disposées autour d'un pore central (Jan & Jan, 1997; Zimmermann & Sentennac, 1999). Le noyau hydrophobe de chaque sous-unité Shaker (Figure 19) se compose de six segments transmembranaires (S1 à S6). Ces domaines sont arrangés de telle manière que les parties N- et C-terminales sont cytoplasmiques

(Shih & Goldin, 1997). Le segment S4 présente des résidus chargés positivement, espacés régulièrement, et constitue l'élément senseur de potentiel du canal (Papazian et al., 1991). Une boucle intramembranaire (P) située entre les segments S5 et S6 et joue un rôle fonctionnel primordial vis-à-vis de la perméation des ions et de la sélectivité ionique de ces canaux. Cette boucle P présente un motif TxxTxGYGD (où x représente des acides aminés non conservés), une des caractéristiques de sélectivité pour les ions K^+ . Dans les canaux Shaker des plantes, la région C-terminale cytosolique possède des domaines de régulation (Zimmermann & Sentenac, 1999), comme un site putatif de fixation des nucléotides cycliques, mais aussi la région appelée KHA (riche en résidus hydrophobe et acides), qui pourrait être impliquée dans tétramérisation des sous-unités (Daram et al., 1997) et/ou du regroupement des canaux dans la membrane (Ehrhardt et al., 1997). Un domaine ankyrine qui serait un site d'interaction avec les protéines régulatrices (Sentenac et al., 1992; Pilot et al., 2003; Lee et al., 2007), est présent entre le site de fixation des nucléotides cycliques et la région KHA dans la plupart des canaux (par exemple, dans six des neuf Shakers *Arabidopsis*).

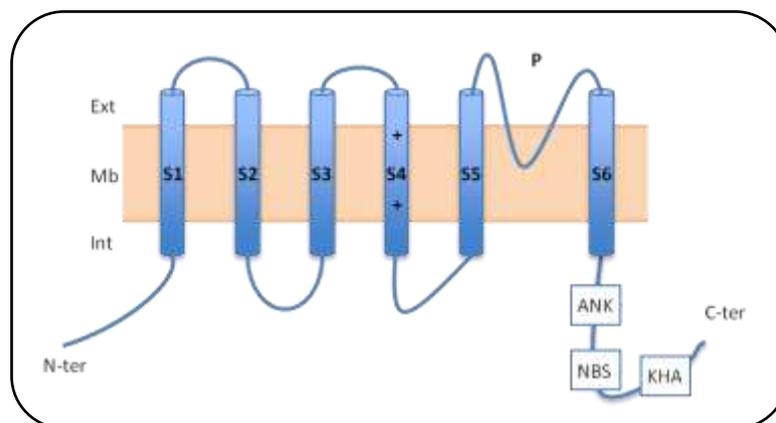


Figure 19. Structure des canaux de la famille Shaker d'*Arabidopsis*.

Abréviations: ext, extracellulaire ; Int, côté cytoplasmique ; mb, membrane ; S1 à S6, segments transmembranaires ; P, domaine des pores ; NBS, domaine putatif de fixation des nucléotides cycliques ; ANK, le domaine ankyrine ; KHA, domaine riche en résidus hydrophobes et acides ; EF, domaines de fixation du Ca^{2+} à motif EF-hand ; +, acides aminés chargés positivement dans le senseur de potentiel du canal, d'après Lebaudy et al., 2007.

À ce jour, sept des neuf protéines Shaker d'*Arabidopsis* ont été caractérisées dans des systèmes hétérologues et se sont trouvées être des canaux très sélectifs au K^+ . Elles peuvent être regroupées en trois sous-familles selon leurs propriétés rectificatives: entrante, faiblement entrante et sortante (Figure 17 et 20). Les informations disponibles suggèrent que ces canaux seraient les principaux systèmes de transport impliqués dans la nutrition K^+ et/ou à la régulation de l'équilibre du K^+ et du potentiel osmotique. Parmi ces canaux Shaker, SKOR (pour *Stelar K⁺ Outward Rectifier*) est localisé au niveau des cellules de la stèle des racines et permet le relargage du K^+ dans la sève brute (Gaymard et al., 1998). Le canal GORK (pour *Guard cell Outward-Rectifier K⁺*) est exprimé dans les cellules de garde et permet la sortie de K^+ pendant la fermeture des stomates (Ache et al., 2000). Il est aussi exprimé dans les racines où il joue un rôle dans la régulation osmotique (Ivashikina et al., 2001) et dans la mort cellulaire suite à son activation par les ROS (Demidchik et al., 2010). En réponse à l' O_3 , il a été montré une inhibition de l'activité des canaux présentant une conductance IRC et ORC, permettant l'entrée de K^+ et l'ouverture stomatique chez *Vicia fabia* (Torsethaugen et al., 1999).

Figure 2A
 FEBS Letters [Volume 581, Issue 12](#), 25 May 2007,
 Pages 2357–2366

Figure 20. Groupes phylogénétiques et des interactions physiques entre les sous-unités au sein de la famille Shaker d'*Arabidopsis*.

Arbre phylogénétique basé sur l'analyse de séquence d'acides aminés. Le groupe 1 contient des canaux à conductance rectifiante entrante, le groupe 2 contient un canal à conductance faiblement rectifiante entrante, le groupe 1' contient une sous-unité régulatrice et le groupe 3 forme des canaux à conductance rectifiante sortante, d'après Lebaudy et al., 2007.

1.4.1.1.2 La famille des AtTPK (pour Twin-Pore K^+)/KCO

Les canaux animaux, appelé KCNK, ont un noyau hydrophobe composé de quatre segments transmembranaires et deux domaines P (Figure 21) qui comportent un motif caractéristique de perméabilité aux K^+ . La plupart d'entre eux s'est révélée être des canaux de sélectif aux K^+ , lorsqu'ils sont actifs, leur probabilité d'ouverture variant faiblement avec le voltage (Patel & Honore, 2001).

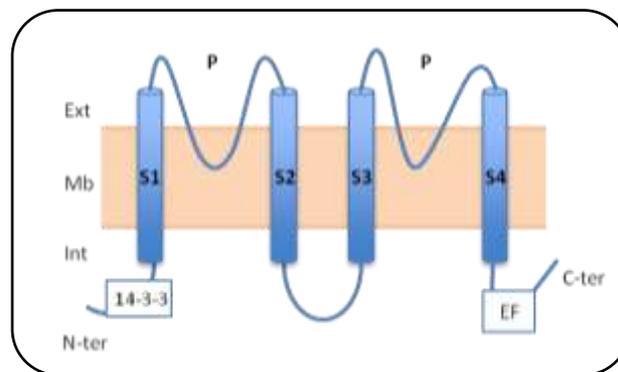


Figure 21. Structure des canaux de la famille TPK d'*Arabidopsis*.

Abréviations: ext, extracellulaire; Int, cytosolique; Mb, membrane; S1 à S4, segments transmembranaires, P, domaine des pores; EF, domaine EF-Hand; N-ter, N-terminale; C-ter, C-terminale. d'après Lebaudy et al., 2007.

Chez *Arabidopsis*, cinq canaux (*AtTPK1*, *AtTPK2*, *AtTPK3*, *AtTPK4* et *AtTPK5*) ont des homologies structurales à ces canaux animaux et possèdent des sites putatifs de liaison au Ca^{2+} de type 14-3-3 et « EF-Hand » dans leur région C- et N-terminale cytosolique, respectivement (Mermann & Sentenac, 1999; Voelker et al., 2006). En plus de leurs sensibilités au Ca^{2+} (Czempinski et al., 1997), une cinétique rapide d'activation du courant et une grande conductance unitaire, permet de distinguer ces canaux à rectification sortante aux canaux à rectification entrante. Jusqu'à présent, la régulation par le Ca^{2+} cytosolique n'a été étudiée que de manière hétérologue dans la levure (Bihler et al., 2005). La plupart de ces canaux est aujourd'hui localisée au niveau du tonoplaste (Czempinski et al., 2002; Schonknecht et al., 2002; Czempinski et al., 2006), à l'exception de *AtTPK4* qui est situé au niveau de la membrane plasmique et est spécifique du tube pollinique (Becker et al.,

2004). Le fonctionnement de ce canal est indépendant du voltage et est bloqué par le Ca^{2+} extracellulaire et les protons cytoplasmiques (Becker et al., 2004).

1.4.1.1.3 La famille Kir-like

Dans les cellules animales, cette famille, à conductance IRK, est caractérisée par un noyau hydrophobe composé de deux segments transmembranaires et un domaine P qui a un motif de perméabilité au K^+ (Doupnik et al., 1995). Ces canaux ne sont pas dépendants du voltage, leur rectification entrante est due à un blocage des courants sortants par le Mg^{2+} et les polyamines cytoplasmiques (Matsuda et al., 1987; Ficker et al., 1994). Un canal chez *Arabidopsis thaliana* possède une structure similaire (Figure 22). Ce canal partage également des similitudes de séquence avec les deux domaines P des canaux de la famille KCO et a donc été nommé KCO3 (Czempinski et al., 1999). Il est localisé au niveau du tonoplaste (Czempinski et al., 2006). En l'absence de toute donnée fonctionnelle, la spéculation sur ses propriétés fonctionnelles est hypothétique.

En plus des canaux sélectif au K^+ , d'autres types de canaux cationiques existe chez *Arabidopsis* qui ont la propriété d'être peu sélectifs vis-à-vis des cations : les NSCC (=Non Selective Cation Channel).

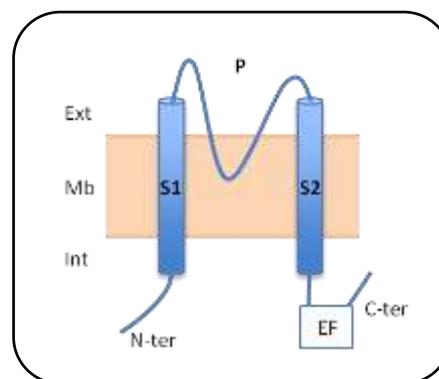


Figure 22. Structure des canaux de la famille Kir-like d'*Arabidopsis*.

Abréviations: ext, extracellulaire ; Int, côté cytoplasmique; mb, membrane; S1 à S2, segments transmembranaires P, domaine des pores ; EF, domaines de fixation du Ca^{2+} à motif EF-hand, d'après Lebaudy et al., 2007.

1.4.1.2 Canaux cationiques aspécifiques : NSCC

Les NSCC sont ubiquitaires dans la membrane plasmique et les endomembranes, plus particulièrement au niveau du tonoplaste des cellules végétales. Plusieurs activités distinctes de canaux perméants aux cations ont été caractérisées au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales. Cependant, les gènes correspondants n'ont pas été identifiés à ce jour. Au niveau moléculaire, 41 gènes peuvent potentiellement coder des canaux cationiques non sélectifs chez *Arabidopsis*, avec une perméabilité au Ca^{2+} , K^+ et Na^+ (Very & Sentenac, 2002, 2003; Shabala & Cui, 2008). Seul un type de canal Ca^{2+} voltage-dépendant (TPC1) a été caractérisé. Il est exprimé dans la membrane vacuolaire. D'autres gènes candidats pouvant coder des canaux cationiques dans la membrane plasmique constituent la famille des récepteurs au glutamate (GluR) (Lacombe et al., 2001) et la famille des canaux homologues au CNGC (=Cyclic Nucleotide-Gated Channel) (Kaplan &

Trout, 1969; Maser et al., 2001). Ces NSCC peuvent être activés par un grand nombre de facteurs comme le voltage (dépolariation ou hyperpolarisation), le calcium, les variations mécaniques, les nucléotides cycliques ou le glutamate (Demidchik et al., 2002). La plupart des études sur les NSCC ont porté sur les racines. Ils seraient responsables de l'influx de Na^+ au niveau racinaire (Demidchik & Tester, 2002; Demidchik & Maathuis, 2007). Le niveau de transcrite est notamment modifié par la salinité pour GluR 2 et les CNGC 1, 19 et 20 (Maathuis, 2006).

1.4.1.2.1 La famille TPC (=Two Pore Channel)

Un gène chez *Arabidopsis*, AtTPC1 (Furuichi et al., 2001), code pour une protéine présentant des similarités avec des canaux Ca^{2+} sensibles au voltage animaux. AtTPC1 est exprimé dans divers tissus et des expériences de RNAi chez *Arabidopsis* et la complémentation du mutant de levure déficient dans l'absorption du Ca^{2+} suggèrent que AtTPC1 peut servir à l'influx de Ca^{2+} de manière dépendante du voltage (Furuichi et al., 2001; Furuichi, 2005). Il est localisé au niveau de la vacuole et correspondrait au canal SV pour *Slow Vacuolar* (Peiter et al., 2005).

1.4.1.2.2 La famille GluR (récepteurs à glutamate)

Les récepteurs à glutamate jouent un rôle essentiel dans la communication cellulaire dans le système nerveux (Nakanishi et al., 1990). Les récepteurs à glutamate métabotropique fonctionnent par couplage à des seconds messagers, et les récepteurs ionotropiques du glutamate sont des canaux cationiques activés par un ligand (Nakanishi et al., 1990).

Une famille de 20 gènes a été identifiée chez *Arabidopsis* présentant des similarités de séquences avec des récepteurs ionotropiques du glutamate animaux (Lam et al., 1998; Lacombe et al., 2001) (Figure 23). Tous ces polypeptides sont susceptibles de partager la même structure, caractérisée par un noyau membranaire englobant un segment transmembranaire, une boucle P, suivi de deux segments transmembranaires, et un site de liaison du ligand extracellulaire. Bien que les domaines P des récepteurs végétaux et animaux soient très éloignés, les récepteurs au glutamate des plantes pourraient, comme leurs homologues animaux, former des canaux cationiques perméants au K^+ , au Na^+ , et/ou au Ca^{2+} (Nakanishi et al., 1990; Lam et al., 1998). Ces récepteurs seraient exprimés dans les racines (Chiu et al., 2002) mais leur rôle dans les plantes demeure mal connu. Toutefois, il a été montré que le glutamate induisait un flux calcique à travers la membrane plasmique des cellules d'*Arabidopsis* (Dennison & Spalding, 2000). Les plantes d'*Arabidopsis* cultivées en présence d'un antagoniste des récepteurs ionotropiques du glutamate animal possèdent un hypocotyle long et leur teneur en chlorophylle est réduite. Ces résultats suggèrent que les GluRs végétales pourraient notamment être impliquées dans la transduction du signal lumineux (Lam et al., 1998).

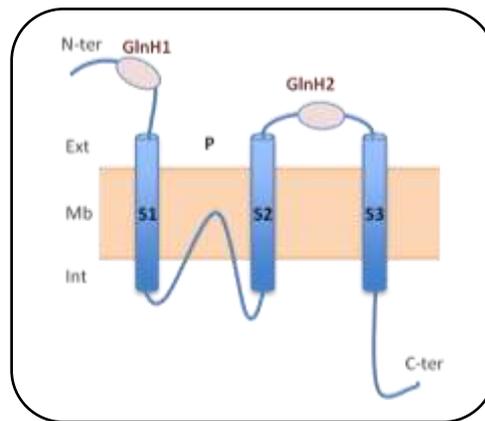


Figure 23. Structure des canaux de la famille GluR d'Arabidopsis.

Abréviations: ext, extracellulaire ; Int, côté cytoplasmique; mb, membrane; S1 à S3, segments transmembranaires ; P, domaine des pores ; GlnH1 et H2, domaine putatif de fixation du glutamate, d'après Véry & Sentenac, 2002.

1.4.1.2.3 La famille CNGC

Les canaux animaux dépendants des nucléotides cycliques ont été initialement identifiés dans les cellules sensorielles (Finn et al., 1996). La liaison de l'AMPC ou du GMPc à un site dans la région cytosolique C-terminale du polypeptide conduit à l'ouverture des canaux. Ces canaux sont faiblement régulés par le voltage et sont perméants à divers cations monovalents et bivalents. En conditions physiologiques, ils dépolarisent la membrane et/ou provoquent l'influx de Ca^{2+} . Certains d'entre eux ont leur sensibilité à l'AMPC ou au GMPc régulés par la liaison directe de la calmoduline cytosolique sur un site dans leur région N-terminale. Structuellement, elles sont liées à la famille Shaker, chaque sous-unité possédant un noyau hydrophobe typique avec six segments transmembranaires (Figure 24). Le domaine P a des similitudes avec celui des canaux sélectifs au K^+ , mais n'a pas le motif YGD. Au lieu de la tyrosine, un acide glutamique peut être présent, conférant des propriétés de perméation au Ca^{2+} .

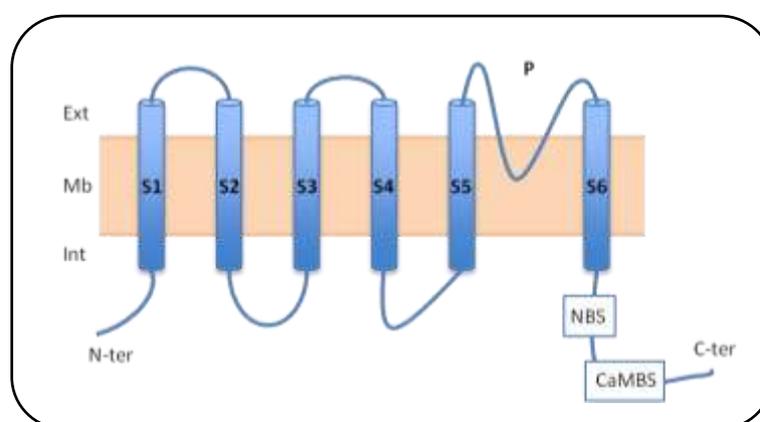


Figure 24. Structure des canaux de la famille CNGC d'Arabidopsis.

Abréviations: ext, extracellulaire ; Int, côté cytoplasmique; mb, membrane; S1 à S6, segments transmembranaires ; P, domaine des pores ; NBS, domaine putatif de fixation des nucléotides cycliques ; CaMBS, domaine de fixation de la calmoduline, d'après Véry & Sentenac, 2002.

Les gènes CNGC codent pour des canaux cationiques faiblement sélectifs (perméant au K^+ , Na^+ et/ou Ca^{2+}), régulés par les nucléotides cycliques et la calmoduline, et sont impliqués dans

l'adaptation et la réponse aux stress abiotiques et biotiques (Moeder et al., 2011). Ils sont exprimés de façon ubiquitaire dans tous les tissus (Talke et al., 2003) et sont localisés dans la membrane plasmique (Arazi et al., 1999; Christopher et al., 2007). Chez *Arabidopsis*, la famille CNGC a 20 membres. Leur domaine P est différent de celui de leurs homologues des animaux (<40% de similarité et l'absence de motif caractéristique TxGExP). Le domaine de fixation des nucléotides cycliques et le site liant la calmoduline, tous deux dans la région C-terminale cytosolique, se chevauchent partiellement (Kohler et al., 1999; Kohler & Neuhaus, 2000). CNGC1 et CNGC2 ont des affinités différentes à la calmoduline et ne lient pas toutes les isoformes de la calmoduline. Peu de données fonctionnelles ont été obtenues pour les canaux *Arabidopsis* CNGC1 et CNGC2. Une conductance à rectification entrante perméant au K^+ a été montrée en présence d'analogues de nucléotide cyclique lipophiles quand CNGC2 a été exprimé dans les ovocytes de xénope (Kohler et al., 1999; Leng et al., 1999). Le canal CNGC2 est également perméant au Ca^{2+} (Leng et al., 2002) et régulerait la production de NO (Ali et al., 2007).

En réponse à l'ozone, le mutant *dnd1* (=Defense No Death 1) codant pour le canal CNGC2 non fonctionnel, ne développe pas la mort cellulaire (Overmyer et al., 2005) et présente une diminution de l'expression des CRK (=Cysteine-rich Receptor-like Kinases) connue pour jouer un rôle important dans la régulation des réponses de défense et la mort cellulaire programmée (Wrzaczek et al., 2010). Cela suggère que CNGC2 joue un rôle important dans la signalisation induite par l' O_3 notamment en régulant les niveaux de Ca^{2+} (Ma et al., 2010; Qi et al., 2010; Ma & Berkowitz, 2011). De plus, le mutant *dnd1* présente des niveaux constitutifs élevés de SA et de protéines de défense (Overmyer et al., 2005). De la même manière, en réponse à un pathogène avirulent, le mutant *dnd1* ne présente aucun développement de la HR (Clough et al., 2000).

1.4.2 Les canaux anioniques de la membrane plasmique chez les végétaux

Dans les cellules végétales tout comme dans les cellules animales, les canaux anioniques et les transporteurs apparaissent comme des acteurs clés dans le contrôle du métabolisme, dans l'entretien des gradients électrochimiques et dans les voies de signalisation conduisant à l'adaptation des plantes aux stress abiotiques et biotiques. Ils contribuent à diverses fonctions physiologiques telles que le contrôle des mouvements des stomates permettant de réguler les échanges de gaz dans les feuilles, l'interaction plante-microbe, le chargement du xylème des racines, la compartimentation des métabolites et le couplage avec des gradients de protons. Chez les végétaux, les plus fortes concentrations en anions se trouvent dans la vacuole qui représente un compartiment de stockage. Les concentrations dans cet organite sont en effet beaucoup plus importantes que dans le cytoplasme, et ce, quelque soit l'anion. Néanmoins, les concentrations en anions varient selon les espèces étudiées, mais aussi selon la méthode d'analyse. La Figure 25 donne un aperçu des teneurs en anions dans le cytoplasme et dans la vacuole des cellules végétales. Les anions inorganiques les plus concentrés sont le nitrate (NO_3^-), le chlore (Cl^-), le carbonate (HCO_3^-), le sulfate (SO_4^-) et le

phosphate (HPO_4^-). Le nitrate et le carbonate tiennent une place particulière dans la mesure où le premier est une source majeure d'azote chez les plantes, et que le second est fortement impliqué dans les phénomènes de régulation du pH intracellulaire et constitue la source primaire de carbone pour la photosynthèse. Les anions organiques représentent une fraction variable des anions présents dans la cellule végétale, et leur concentration augmente lorsque la concentration en anions inorganiques devient insuffisante dans le milieu extracellulaire (Barbier-Brygoo et al., 2000). Ces anions proviennent en majorité du métabolisme cellulaire, le malate étant l'anion organique le plus abondant.

La majorité des informations sur les canaux anioniques étudiés chez les plantes concernent des canaux localisés dans la membrane plasmique (Table 1). L'ouverture de ces canaux entraîne, en général, une sortie d'anions dans le milieu extracellulaire ou une entrée d'anions dans le cytosol, qui est la conséquence (i) de la différence de potentiel au niveau de la membrane plasmique, et (ii) d'un gradient de concentration en anions entre l'intérieur de la cellule et le milieu extracellulaire (Figure 25).

L'utilisation combinée d'approches pharmacologique et électrophysiologique a permis de caractériser deux types de canaux anioniques dans la membrane plasmique des cellules végétales : les canaux voltage-dépendant et les canaux mécano-sensibles (*stretch-activated*). L'activation des canaux voltage-dépendants dépend de la variation du potentiel transmembranaire. Certains canaux sont activés par hyperpolarisation et d'autres par dépolarisation de la membrane plasmique. Les canaux mécano-sensibles sont, quant à eux, activés par des modifications de la tension membranaire (Cosgrove & Hedrich, 1991; Zimmermann & Sentenac, 1999; Haswell et al., 2008).

Table 1 : Canaux ioniques de la membrane plasmique chez les plantes

Type Activation	Organisme	Type et conductance du canal	Cinétique	Sélectivité	Régulateurs	Inhibiteurs	Références
Rapide	Blé (<i>Triticum aestivum</i>) épiderme racinaire	Activé par dépolarisation Rectifiant sortant	Activation Rapide	$\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$	$\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$	DIDS > NA > NPPB > Zn^{2+}	Skerret & Tyerman 1994; Garrill et al. 1996
	Blé Apex racinaire	Activé par $[\text{Al}^{3+}$ -Rectifiant entrant	Activation Rapide (inactivation lente)	$\text{Mal}^{2-} > \text{Cl}^-$	Cl^-_{ext}	DPC > NA	Ryan et al. 1997; Zhang et al. 2001
	Mais (<i>Zea mays</i>) Apex racinaire	Activé par dépolarisation Rectifiant sortant	Activation Rapide (inactivation lente)	Cl^-			Pimeros & Kochian 2001; Pimeros et al. 2002
	<i>Arabidopsis thaliana</i> épiderme racinaire	Activé par dépolarisation (ARAC)	Activation Rapide (inactivation lente)	$\text{SO}_4^{2-} > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$	Anions extracellulaires; SO_4^{2-} intracellulaire	NA > NPPB > A-9-C	Diatloff et al. 2004
	<i>H. vulgare</i> Racine XPCs	Voltage-dépendant Rectifiant entrant/sortant	Activation Rapide (inactivation lente)	$\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{malate}$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ $[\text{NO}_3^-]_{\text{ext}}$	DIDS=IAA-94	Kohler & Raschke, 2000
	Lupin épiderme racinaire	Activé par Hyperpolarisation Rectifiant entrant	Activation Rapide (inactivation lente)	$\text{Cl}^{2-} = \text{Mal}^{2-} >> \text{Cl}^-$	Faiblement dépendant de la carence en P	A-9-C	Zhang et al. 2004
	<i>V. faba</i> Cellules de garde	Déactivation par hyperpolarisation Rectifiant entrant. GCAC	Rapide (ms), Activation et désactivation dépendante du temps; (inactivation lente)	$\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{mal}^{2-} >> \text{acet}^- > \text{pro}^-$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ $[\text{ATP}]_{\text{cyt}}$ pH_{cyt} Auxine, mal^{2-} , acét, pro-, Cl- et SCN-.	NA=IAA- 94=NPPB>DIDS >> EA>A-9-C>probenecid	Hedrich et al., 1990; Marten et al., 1991; Schroeder & Keller, 1992; Hedrich & Marten, 1998; Hedrich et al., 1994; Schmidt & Schroeder, 1994; Schmidt et al., 1995; Schulz-Lessdorf et al., 1996; Dietrich & Hedrich, 1998
	<i>A. thaliana</i> épiderme racinaire	Activé par dépolarisation R-type (PR-ARAC)	Activation Rapide	$\text{Cl}^{2-} = \text{Mal}^{2-} >> \text{Cl}^-$	Fortement dépendant de la carence en P		Diatloff et al. 2004
	Mais Apex racinaire	Activé par $[\text{Al}^{3+}$ -Rectifiant entrant	Activation Rapide	Cl^-	Cl^-_{ext}	NA > DIDS	Pimeros & Kochian 2001; Pimeros et al. 2002
	Mais Apex racinaire	Activé par $[\text{Al}^{3+}$ -Rectifiant entrant	Activation Rapide	$\text{Cl}^- >> \text{Mal}^{2-} > \text{Cl}^{2-}$			Kollmeier et al. 2001
<i>Z. mays</i> et <i>A. thaliana</i> Suspension cellulaire	Activé par dépolarisation Rectifiant sortant (ORAC)	Activation Rapide		Induit par une forte $[\text{Cl}^-]_{\text{ext}}$		Fairley et al., 1991; Cerana & Colombo, 1992; Garrill et al., 1994	
<i>P. sativum</i> Cellules de mésophylle	Fortement dépendant du voltage Rectification entrante (HAAC)	Activation dépendante du temps (100–400 ms), Inactivation lente (1–10 s)	$\text{F}^- > \text{I}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{mal}^{2-}$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ $[\text{ATP}]_{\text{cyt}}$	SITS	Elzenga & Van Volkenburgh, 1997	

	HAAC	Activation Rapide	Cl ⁻ >>> autres anions	Zn ²⁺ > EA	Taylor & Brownlee, 2003
Rapide (suite)	<i>T. aestivum</i>	ORAC	NO ₃ ⁻ = Cl ⁻ > I ⁻	DIDS > ClO ₄ ⁻	Skerrett & Tyerman, 1994
	Cellules racinaires				
	<i>Medicago sativa</i>		Activation instantanée		
	Poils absorbants			DIDS > A-9-C	Bouteau et al., 1999
	<i>A. thaliana</i>	Activé par dépolarisation Rectifiant sortant	Mal ²⁻ > NO ₃ ⁻ > Cl ⁻		Sasaki et al., 2010
	<i>A. thaliana</i>	Activé par depolarization Rectifiant entrant		A-9-C	Bouzigarne et al., 2006
	Poils absorbants				
	<i>A. thaliana</i>	Dépendant du voltage	NO ₃ ⁻ > SO ₄ ²⁻ > Cl ⁻ > HCO ₃ ⁻ >>> mal ²⁻	MA >>> NPPB > IAA-94	Thomine et al., 1995, 1997; Frachisse et al., 1999; Diathloff et al., 2004;
	Épiderme d'hypocotyl				Dauphin et al. 2001
	<i>A. thaliana</i> , Poils absorbants	Activé par dépolarisation S-type (ARAC)	?		DIDS
<i>V. faba</i>	Activé par dépolarisation Voltage dépendant Rectifiant entrant	NO ₃ ⁻ ; imperméable au SO ₄ ²⁻		MA >>> NPPB > A-9-C > IAA-94	
Cellules de garde				Schroeder & Keller, 1992	
Lupin (<i>Lupinus albus</i>) épiderme racinaire	Activé par dépolarisation Rectifiant sortant	Cl ⁻ >>> Cit ³⁻ > H ₂ PO ₄ ⁻		A-9-C	
				Zhang et al. 2004	
Lent	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Vigna unguiculata</i>	Voltage-indépendant Rectifiant entrant	Cl ⁻ = NO ₃ ⁻	Ca ²⁺ _{cyt}	Kohler & Raschke 2000
	L'orge (<i>Hordeum vulgare</i>) Racine XPCs	(X-IRAC)			
	<i>H. vulgare</i>	Activé par dépolarisation	Cl ⁻		
	Racine XPCs	S-type (X-SLAC)		Ca ²⁺ _{cyt}	Kohler & Raschke (2000)
	Mais (<i>Zea mays</i>) Stèle racinaire	Rectifiant entrant/sortant (X-OUAC)	NO ₃ ⁻ = Cl ⁻ > I ⁻ > Mal ²⁻ > SO ₄ ²⁻ > Cit ³⁻	NA	Gilliham & Tester 2005
	<i>A. thaliana</i>			CO ₂ , ABA, O ₃	Megi et al. 2008, Saji et al. 2008, Vahisalu et al. 2008
	Cellules de garde				Forestier et al., 1998
	<i>A. thaliana</i>	Activé par dépolarisation	NO ₃ ⁻ > Cl ⁻ > SO ₄ ²⁻	DPC=glibendamide >>> A-9-C	Frachisse et al., 2000
	Cellules de garde				
	Épiderme d'hypocotyl				

Abbreviations : ABA, abscisic acid; ARAC, Arabidopsis root anion channel; A-9-C, anthracene-9-carboxylic acid; Cit, citrate; DIDS, 4,4-diisothiocyanostilbene-2,2-disulfonic acid; DPC, diphenylamine-2-carboxylic acid; Mal, malate; NA, niflumic acid; NPPB, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid; PR-ARAC, phosphate-regulated Arabidopsis root anion channel; X-IRAC, inwardly rectifying anion

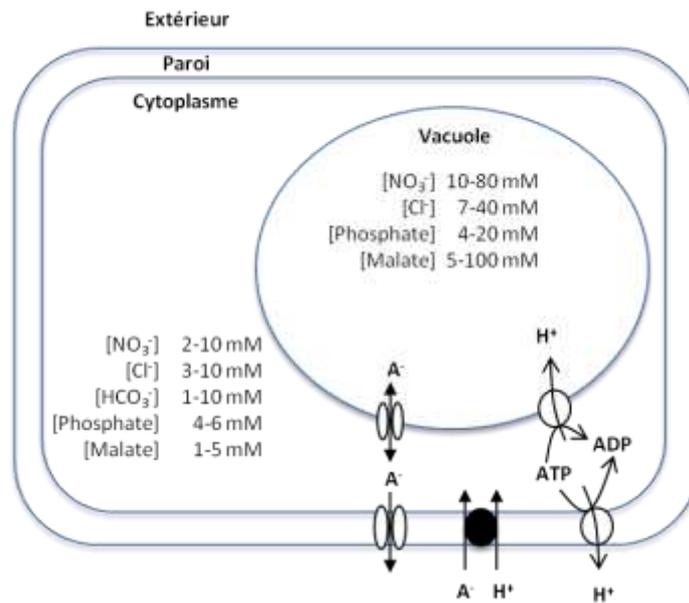


Figure 25. Répartition des principaux anions dans les cellules végétales, d'après Barbier-Brygoo et al. (2000).

Parmi les canaux voltage-dépendants activés par dépolarisation, trois types de canaux anioniques ont été mis en évidence : les canaux de type rapide (R pour *rapid*), les canaux de type lent (S pour *slow*) et les canaux de type rectifiant entrants (IRAC pour *Inward Rectifying Anion Current*). Ces différents types de canaux peuvent être co-localisés dans la membrane plasmique d'une même cellule, comme cela s'observe dans les cellules de garde (Schroeder et al., 1993), et d'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* où les types S et R sont présents (Frachisse et al., 2000). Au niveau des poils absorbants, les types S et IRAC peuvent être détectés dans la membrane plasmique (Dauphin et al., 2001; Bouizgarne et al., 2006). Ces différents types de canaux diffèrent principalement par leur cinétique d'activation et de désactivation. Concernant le type R, ses cinétiques d'activation et de désactivation sont très rapides, de l'ordre de microsecondes, entraînant un efflux d'anions très transitoire. A l'inverse, les canaux de type S ont des propriétés d'activation et de désactivation lentes, de l'ordre de quelques secondes, permettant ainsi un efflux d'anions prolongé. Les canaux de type IRAC présentent une activation rapide mais avec une forte rectification entrante. L'activation de ces canaux entraîne une sortie/entrée de charges négatives de la cellule se traduisant par une initiation ou une amplification de la dépolarisation/hyperpolarisation de la membrane plasmique. Comme le schématise la Figure 26, selon le type de canal mis en jeu, la dépolarisation/hyperpolarisation membranaire est plus ou moins intense. Ainsi, le canal rapide provoque une dépolarisation transitoire de la membrane, alors que l'activation du canal lent provoque une dépolarisation plus soutenue dans le temps. Quant au canal IRAC, il provoque une hyperpolarisation rapide de la membrane.

Ces différents types de canaux se différencient également par leurs propriétés pharmacologiques, c'est-à-dire leur sensibilité aux inhibiteurs de canaux anioniques, et par leur sélectivité anionique (cf. Tableau). La régulation des canaux anioniques est très complexe. Un aperçu des différents modes de régulation est présenté dans le tableau I. La différence de potentiel

transmembranaire, la concentration en calcium libre cytoplasmique (Ca^{2+}_{cyt}), le pH cytoplasmique, la fixation de nucléotides, des évènements de phosphorylation/déphosphorylation, ainsi que la présence d'anions dans le milieu extracellulaire conditionnent leur ouverture (Ward et al., 1995; Colcombet et al., 2001; Roberts, 2006).

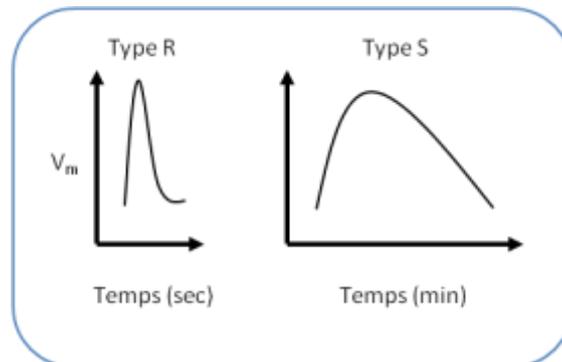


Figure 26. Dépolarisation de potentiel membranaire au cours du temps selon le type de canal anionique.

1.4.2.1 Famille des CLC: Canaux Chloride et les échangeurs Proton/Anion

Dans les cellules animales, plusieurs classes de canaux chlorure ont été décrits sur la membrane plasmique. Il s'agit notamment de la famille des CLC (Jentsch, 2008), les canaux récepteurs à GABA ou à glycine (Colquhoun & Sivilotti, 2004), canaux anioniques VRACs (pour *volume-regulated anion channels* vracs), et les bestrophines (Hartzell et al., 2008). Chez les plantes, une famille de sept homologues aux gènes des protéines membranaires CLC (nommées de a à g) est présente dans le génome d'*Arabidopsis*. Bien que chez les mammifères, 4 canaux de la famille des CLC (ClC-1, -2 -Ka and -Kb) (Zifarelli & Pusch, 2010) soient localisés au niveau de la membrane plasmique, celles présentes dans les cellules végétales sont ciblées au niveau des organites intracellulaires (Hechenberger et al., 1996; Teardo et al., 2005; De Angeli et al., 2006; Ludwig et al., 2007; Zifarelli & Pusch, 2010). Ces échangeurs et canaux voltage-dépendants ont principalement une sélectivité au chlore (Cl^-) tandis que la protéine AtClc-a est sélective au nitrate (NO_3^-). D'autres recherches sont nécessaires pour déterminer si une protéine végétale de la famille des CLC est ciblée à la membrane plasmique et quel type de mécanisme biophysique de transport de tels transporteurs utilise.

1.4.2.2 Canaux/Transporteurs anionique ALMT

Chez le blé (*Triticum aestivum*), le canal TaALMT1 (pour *ALuminum-activated Malate-permeable Transporter*), localisé au niveau de la membrane plasmique, confère une résistance à l'aluminium (Sasaki et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005; Zhang et al., 2008). Parmi les 14 gènes d'*Arabidopsis thaliana* présentant une homologie à TaALMT1, AtALMT1 est également un transporteur de malate, exprimé au niveau de la membrane plasmique des racines et lié à la

résistance en aluminium (Hoekenga et al., 2006). En revanche, *AtALMT9* code pour un canal vacuolaire impliqué dans l'homéostasie du malate (Kovermann et al., 2007). Une étude récente a montré que *AtALMT12*, un transporteur perméable plus particulièrement au Cl^- et au NO_3^- était nécessaire pour la fermeture stomatique (Sasaki et al., 2010). Une approche électrophysiologique a montré que le mutant *almt12* présente des courants anioniques de type rapide diminué en réponse au CO_2 , l'ABA ou l'obscurité (Meyer et al., 2010). Par conséquent, les canaux anioniques de type ALMT peuvent avoir plusieurs fonctions dans l'homéostasie des anions au niveau cellulaire, contribuant à la régulation de la croissance et aux variations de l'environnement.

1.4.2.3 SLAC1 : Canal anionique lent

En dehors de gènes codant pour les canaux/transporteurs à malate ALMT et les CLC, jusqu'à très récemment, les gènes codant pour d'autres canaux anioniques étaient encore inconnus chez les plantes. Récemment, des cribles génétiques de sensibilité à l' O_3 et d'insensibilité des feuilles au dioxyde de carbone (CO_2) ont conduit à l'isolement d'un gène, nommé *SLAC1* (pour *Slow Anion Channel-associated 1*), qui code pour une protéine de la membrane plasmique dans les cellules de garde (Negi et al., 2008; Saji et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Les allèles mutés *slac1* montrent une insensibilité au CO_2 , à l'ABA, et à l' O_3 induite par la fermeture des stomates (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Cette hypersensibilité à l'ozone est due à une pénétration accrue de celui-ci dans les feuilles par les stomates restants ouverts, et accentuant les dommages dans les mutants *slac1*. Les analyses en patch clamp des deux allèles mutants *slac1* ont montré que les courants anioniques lents (S-type) sont considérablement diminués, alors que les courants des canaux anioniques rapides (R-type) et des canaux perméables au Ca^{2+} de la membrane plasmique étaient intacts dans les cellules de garde. Donc *SLAC1* est important pour le fonctionnement stomatique puisqu'il permet un efflux prolongé d'anion.

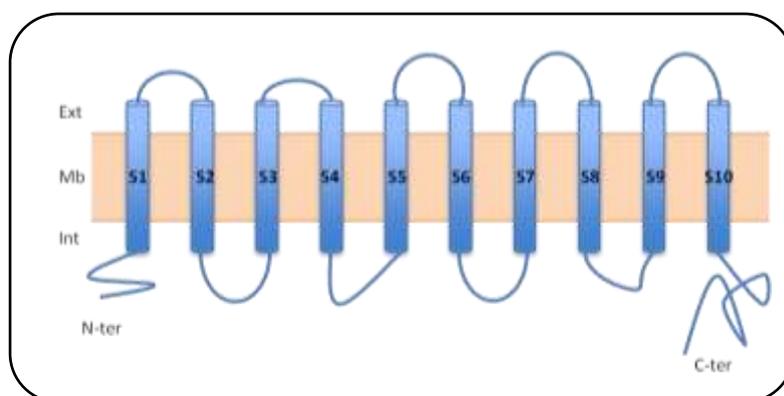


Figure 27. Structure du canal *SLAC1* d'*Arabidopsis*.

Abréviations: *ext*, extracellulaire ; *Int*, côté cytoplasmique; *mb*, membrane; *S1* à *S10*, segments transmembranaires, d'après (Chen et al., 2010).

SLAC1 fait partie d'une famille de gènes avec cinq membres dans le génome d'*Arabidopsis* (*SLAH1*, 2, 3 et 4). Le gène *SLAC1* code pour une protéine membranaire qui a neuf à dix domaines

transmembranaires avec de grands domaines N et C terminal (Figure 27). Les protéines SLAC présentent une faible homologie dans leurs domaines transmembranaires avec un transporteur à malate de champignons et bactériens de la famille TDT (pour *Tellurite-resistance/Dicarboxylate Transporter*) (Camarasa et al., 2001). Lee et al., (2009) ont montré que cette protéine est régulée par le couple kinase/phosphatase OST1 (*Open stomata 1*) et PP2C dans la réponse stomatique, mais aussi par une kinase CDPK (Geiger et al., 2010). En réponse à l'O₃, SLAC1 semble être impliqué dans la génération de ROS (Vahisalu et al., 2010).

1.4.2.4 Canaux IRAC

Les canaux IRACs ont été détectés dans diverses espèces de plantes et d'algues, comme chez le pois (*Pisum sativum*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), l'orge (*Hordeum vulgare*), chez *A. thaliana*, le phytoplancton (*Coccolithus pelagicus*), et l'algue marine *Utricularis Valonia* (Tavares et al., 2011). La seule fonctionnalité que ces canaux ont en commun est une rectification entrante dépendante du voltage. Chez le maïs (*Zea mays*) et l'orge, la rectification entrante est amplifiée par l'augmentation du Ca²⁺ cytosolique, mais le mécanisme d'ouverture est distinct (Kohler & Raschke, 2000; Gilliam & Tester, 2005). Chez le maïs, le canal IRAC est dépendant de la tension (probabilité d'ouverture augmente à des tensions négatives) tandis que chez l'orge, l'ouverture du canal est considéré comme indépendant de la tension (Barbier-Brygoo et al., 2000; Roberts, 2006; Tavares et al., 2011). Ces canaux seraient responsables du maintien de l'homéostasie anionique de la cellule comme par exemple dans la tolérance au stress salin, pendant la repolarisation du potentiel de membrane et dans la régulation du stress osmotique causé par la sécheresse ou l'excès d'eau. Il permet également de prévenir les fortes dépolarisations/hyperpolarisations de la membrane plasmique (Cf. tableau). Aucune donnée moléculaire n'est disponible à ce jour sur ce type de canaux.

1.4.2.5 Canaux mécano-dépendant

Dans les systèmes bactériens et animaux, les canaux ioniques mécano-sensibles (MS) permettent la perception des variations de pression, le toucher et le son (Hamill & Martinac, 2001; Kung, 2005; Vogel & Sheetz, 2006). Bien que les plantes réagissent à une large variété de stimuli mécaniques, et que beaucoup d'activités mécano-sensibles de canaux ioniques ont été caractérisées dans les membranes de plantes par la méthode patch-clamp, les mécanismes moléculaires de la perception mécanique restent encore très mal compris (Haswell, 2007). Chez *Arabidopsis*, 10 protéines MSCs (pour *MechanoSensitive Channel of Small conductance*) ont été trouvées dans le génome, nommées MSL1 à 10 (Kloda & Martinac, 2002; Pivetti et al., 2003; Haswell, 2007). Les prédictions de structure montrent que les MSL possèdent six domaines transmembranaires et leurs parties N- et C-ter sont cytosoliques (Figure 28). MSL2 et MSL3 sont impliqués dans le contrôle de la morphologie des organites (Haswell & Meyerowitz, 2006; Nakayama et al., 2007). Cinq protéines MSL se trouvent dans la membrane plasmique des cellules de la racine

MSL4, 5, 6, 9 et 10 (Haswell et al., 2008). L'utilisation de lignées mutantes *msl9* et *msl10* a montré une activité canal mécano-dépendante avec une sélectivité plus importante aux ions Cl^- qu'au Ca^{2+} au niveau des racines d'*A. thaliana* (Haswell et al., 2008).

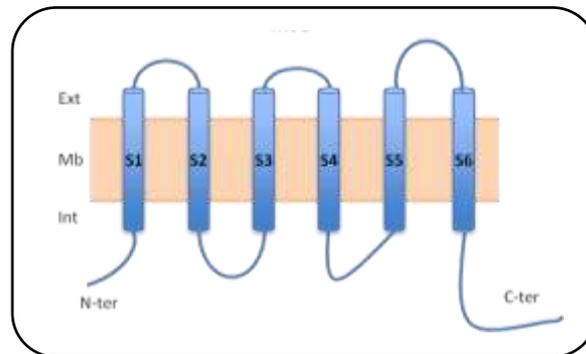


Figure 28. Structure des canaux mécano-dépendant d'*Arabidopsis*.

Abréviations: ext, extracellulaire ; Int, côté cytoplasmique; mb, membrane; S1 à S6, segments transmembranaires, d'après Haswell, 2007.

1.4.3 Canaux ioniques et PCD

C'est dans les modèles animaux que le rôle des canaux ioniques de la membrane plasmique a été le plus étudié, en particulier lors de l'apoptose qui est une forme de PCD (Yu & Choi, 2000). Ainsi, la régulation des flux ioniques à travers la membrane est nécessaire à la plasmolyse. Ce mécanisme, bien décrit chez les animaux lors de l'apoptose (Yu & Choi, 2000; Okada et al., 2006), est appelé AVD pour *Apoptosis Volume Decrease* (Figure 29). Cette plasmolyse est mise en place par une sortie d'ions vers l'extérieur à travers les canaux permettant ainsi un efflux massif d'eau (Figure 29). Ainsi lors du déclenchement de l'apoptose dans les cellules animales, l'activation des canaux K^+ et/ou Cl^- conduisant à l'efflux de K^+ et/ou de Cl^- , induirait l'efflux d'eau. Une réduction des concentrations intracellulaires des ions K^+ ou Cl^- et une diminution du volume cellulaire en résultent. Ces deux phénomènes peuvent promouvoir l'apoptose indépendamment. De nombreuses études émettent l'hypothèse que la diminution du volume cellulaire, ou plus précisément les efflux de K^+ et des anions, jouent un rôle crucial dans la régulation de la machinerie cellulaire impliquée dans la mort cellulaire. Plus particulièrement, il a été démontré que la diminution du K^+ intracellulaire induit l'activation des caspases favorisant ainsi l'activité catalytique optimale des nucléases apoptotiques (Perregaux & Gabel, 1994; Hughes et al., 1997; Dallaporta et al., 1998).

Figure 1 de Yu & Choi 2006.

<http://www.pnas.org/content/97/17/9360.full>

Figure 29. Modèle de l'Apoptosis Volume Decrease (AVD).

D'après Yu & Choi (2006).

1.4.3.1 Rôle dans la réponse hypersensible

Chez les plantes, différentes études ont montrées le rôle des canaux de la membrane plasmique lors de la réponse hypersensible (HR). La mise en place de la HR est très rapide et limitée à la zone infectée par le pathogène. Parmi les évènements de signalisation associés à cette mise en place de la HR, les flux ioniques font partie des évènements les plus précoces observés. Les modifications des flux d'ions se déclenchent très rapidement, de quelques secondes à quelques minutes, après la perception d'un stimulus. La régulation des flux ioniques à travers la membrane est nécessaire à la plasmolyse qui accompagne la HR, ressemblant ainsi à l'AVD (Figure 30) (van Doorn & Woltering, 2005).

Chez les plantes, très peu d'études ont portés sur l'efflux de K^+ et plus généralement des cations lors de la PCD. La plupart des données est reportée sur le stress salin (Shabala & Cuin, 2008) et un éliciteur d'origine bactérien, les harpines (Reboutier et al., 2007). Chez *Pectobacterium amylovorum*, la harpine N (HrpNea) induit une activation des courants K^+ de type ORC permettant un efflux de K^+ et une production de ROS sur culture cellulaire d'*Arabidopsis* (Reboutier et al., 2007) et de tabac (Popham et al., 1995; Pike et al., 1998). Au niveau racinaire, l'efflux de K^+ , activé par les ROS, est nécessaire pour induire la PCD lors d'un stress salin (Demidchik et al., 2010). Ainsi, les symptômes de PCD sont retardés en présence de pièges à ROS, d'inhibiteurs de canaux et chez le mutant *gork1-1*.

Les premières études concernant les canaux anioniques lors de la PCD ont été principalement effectuées par des approches pharmacologiques (Jabs et al., 1997; Zimmermann et al., 1998). L'activation des efflux d'anions a été principalement décrite comme un évènement précoce induit lors des interactions plantes/pathogènes et lors de l'immunité innée (Garcia-Brugger et al., 2006). La plupart des études a portée sur la HR suite à une infection d'un pathogène ou le traitement par des éliciteurs purifiés, comme les harpines (Reboutier et al., 2007), la thaxtomine (Errakhi et al., 2008), l'acide oxalique (Errakhi et al., 2008) ou la cryptogéine (Wendehenne et al., 2002). Dans les suspensions cellulaires de tabac, la cryptogéine induit un efflux d'anions important et rapide, au travers de canaux anioniques de type lent (Gauthier et al., 2007), qui se traduit par une baisse d'environ 60% de NO_3^- intracellulaire en 1 h (Wendehenne et al., 2002). De même, l'acide oxalique induit une mort cellulaire dépendant de l'activation des canaux anioniques chez *Arabidopsis* (Errakhi et al., 2008). Des approches pharmacologiques indiquent que ces canaux anioniques jouent un rôle essentiel dans la signalisation comme la stimulation du métabolisme oxydatif, l'activation des MAPK, et l'activation transcriptionnelle de gènes de défense (Jabs et al., 1997; Ligterink et al., 1997; Wendehenne et al., 2002; Errakhi et al., 2008). Il est intéressant de noter que la diminution de l'activité des canaux anioniques de type SLAC serait un évènement essentiel lors de la mort cellulaire induite par HrpNea, une harpine sécrétée par une bactérie pathogène *Pectobacterium amylovorum* (Reboutier et al., 2005).

Figure 1 in van Doorn et al., 2005
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749469>

Figure 30. Schéma simplifié de la morphologie de la mort cellulaire programmée chez les cellules végétales et animales.

Schéma modifié d'après van Doorn et al., (2005).

La nature du lien entre l'efflux d'anions et de la HR, qui est une forme de PCD, n'est pas résolue à l'heure actuelle, mais le Ca^{2+} pourrait y participer (Lecourieux et al., 2006; Yoshioka et al., 2006). En effet, la thaxtomine comme la cryptogéine induit également l'activation des canaux anioniques par l'intermédiaire d'une variation du Ca^{2+} libre cytosolique et, est nécessaire pour l'induction de la PCD (Errakhi et al., 2008). De même, l'implication d'un canal Ca^{2+} (OSTPC1) a été démontrée dans l'induction des réponses de défense par un éliciteur dans la HR chez le riz (Kurusu et al., 2005). Une fonction des canaux anioniques chez les plantes pourrait être d'initier ou d'amplifier la dépolarisation de la membrane plasmique qui, à son tour, active les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, conduisant à un influx calcique et à une augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ libre (Ward et al., 1995). Les ROS peuvent aussi activés ces canaux Ca^{2+} chez les plantes (Pei et al., 2000; Kwak et al., 2003; Demidchik et al., 2009). Par ailleurs, cette dépolarisation induit par l'efflux d'anion pourrait activer les canaux K^+ de la membrane plasmique conduisant à un efflux de K^+ et une perte d'eau concomitante. Chez les plantes, la diminution du potentiel hydrique observée dans les interactions incompatibles menant à la HR, est un facteur limitant la croissance microbienne (Wright & Beattie, 2004). Aussi, ce processus pourrait contribuer à la plasmolyse des cellules généralement observée lors de la HR ou la PCD.

De nombreuses études émettent l'hypothèse que la diminution du volume cellulaire, ou plus précisément les efflux de K^+ et des anions, jouent un rôle crucial dans la régulation de la machinerie cellulaire impliquée dans la mort cellulaire. Plus particulièrement, il a été démontré que la diminution du K^+ intracellulaire induit l'activation des caspases favorisant ainsi l'activité catalytique optimale des nucléases apoptotiques (Perregaux & Gabel, 1994; Hughes et al., 1997; Dallaporta et al., 1998). Bien qu'aucun gène homologue de caspase n'ait été trouvé dans le génome d'*A. thaliana*, des protéinases (sérine protéinases et métacaspases) présentant des activités de type caspase, sont impliquées dans la mort cellulaire (Hatsugai et al., 2004; Lam, 2005; He et al., 2008; Zhang et al., 2010). Parmi ces protéinases, les VPEs (pour *Vacuolar Processing Enzyme*) sont des cystéine-protéinases présentant une activité de type caspase-1 qui seraient responsables de la maturation des protéines vacuolaires. Ces VPEs jouent un rôle dans différents types de mort cellulaire (Kinoshita et al., 1999; Hara-Nishimura et al., 2005). Hatsugai et ses collaborateurs (2004) ont prouvé que les lignées RNAi *VPE1α* et *VPE1β* chez *Nicotiana benthamiana* ne présentent plus de HR lors d'une infection par le virus de la mosaïque du tabac (TMV). De même, l'absence de VPE supprime la plasmolyse de la vacuole, entraînant la mort cellulaire induite par les mycotoxines (Kuroyanagi et al., 2005). Chez le tabac, le niveau de transcrite de ces VPEs semble aussi être dépendant de l'activation

des canaux anioniques (Gauthier et al., 2007). Par ailleurs, les VPEs joueraient aussi un rôle dans la fermeture stomatique et la production de NO (Zhang et al., 2010).

Ainsi, selon la nature du stimulus perçu par la plante, les voies de signalisation induites sont diverses et spécifiques parmi lesquelles les canaux ioniques jouent un rôle crucial dans la transduction du signal dans de nombreuses fonctions physiologiques. Néanmoins, leurs régulations et leurs interactions avec les autres événements de signalisation peuvent être complexes notamment lors de la PCD.

1.5 Objectif du travail de thèse

Dans ce contexte, cette thèse se divise en deux principaux volets. Le premier correspond à la compréhension de l'implication des canaux anioniques dans la réponse à l'ozone. Le second correspond à l'étude de la régulation des canaux potassiques lors de ce stress oxydatif. Le système cellulaire des cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana* ont été choisi comme modèle d'étude afin de :

- (1) Mettre en évidence l'éventuelle implication des canaux ioniques de la membrane plasmique dans la réponse à l'ozone
- (2) Mettre en évidence les liens entre l'activation des canaux et d'autres événements connus dans la réponse à l'ozone tels que :
 - i. La production de ROS
 - ii. La variation calcique
 - iii. Les hormones
 - iv. Les activités de type caspase
 - v. La PCD

Chapitre 2

Rôle des canaux anioniques en réponse à l'ozone

2.1 Introduction

L'ozone à forte concentration induit chez les plantes une PCD ressemblant à une HR (Kangasjarvi et al., 1994). La HR est notamment caractérisée par une plasmolyse typique des processus de PCD chez les plantes comme chez les animaux (van Doorn et al., 2011). Un des processus de PCD les mieux décrits en animal est l'apoptose pour laquelle la plasmolyse ou « *Apoptosis Volume Decrease* » (AVD) implique des efflux de K^+ et d'anions au travers des canaux ioniques conduisant à la perte d'eau (Yu & Choi, 2000). Nous avons dans cette première partie recherché l'éventuelle implication des canaux anioniques dans la mort cellulaire induite par l' O_3 . Nous avons pour cela utilisé le modèle de cellules en culture d'*A. thaliana* (Figure 31). L'uniformité, l'accessibilité et la moindre complexité des cultures cellulaires en font un outil de choix pour étudier la régulation des réponses cellulaires lors de la PCD (McCabe & Leaver, 2000). De plus, ce modèle est intéressant dans la mesure où il répond, au moins en ce qui concerne les flux d'ions, comme les cellules de garde (Jeannette et al., 1999; Brault et al., 2004; Meimoun et al., 2009) pour lesquelles ces flux sont bien décrits et clairement reliés au processus de plasmolyse permettant la fermeture stomatique (Ward et al., 2009).

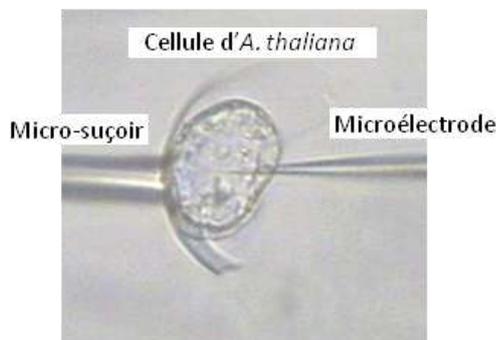
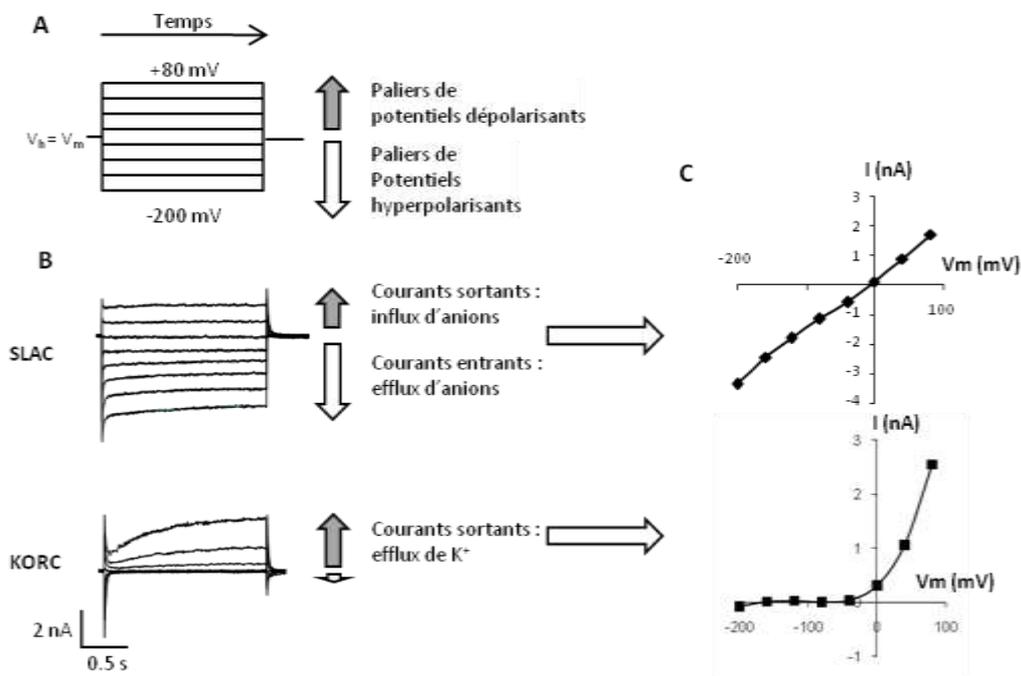


Figure 31. Cellule d'*Arabidopsis thaliana* fixée par un micro-suçoir puis piquée par une micro-électrode.

La technique du voltage imposé à une électrode (dSEVC), initialement développée sur des cellules animales ne permettant pas l'utilisation de la technique à deux électrodes (Finkel & Redman, 1984) puis par l'équipe sur différents types cellulaires végétaux (Bouteau et al., 1996; Forestier et al., 1998; Jeannette et al., 1999; Kurkdjian et al., 2000), permet de suivre les variations de la différence de potentiel transmembranaire et l'activité des canaux ioniques de la membrane plasmique sur des cellules vivantes (paroi cellulaire conservée, milieu interne non contrôlé). Par rapport à la technique du patch-clamp qui impose la préparation de protoplastes, le dSEVC permet d'étudier les activités des canaux ioniques en réponse à des stimuli environnementaux dans un contexte le plus physiologique possible. Autant que faire ce peut et, dans la même logique, les cellules sont utilisées dans leur milieu de culture pour éviter tous stress supplémentaires. Dans ces conditions, deux principaux types de courants ioniques, aussi impliqués dans la fermeture stomatique, ont été décrits dans les cellules en cultures d'*A. thaliana*. Des courants anioniques de type lent (*Slow Anion Current*,

SLAC) (Reboutier et al., 2002; Brault et al., 2004), et des courants potassiques rectifiants sortants (K^+ outward rectifying currents, KORC) (Jeannette et al., 1999; Reboutier et al., 2002) (Figure 32).

Nous avons dans un premier temps recherché l’éventuelle activation de courants anioniques de type SLAC en réponse à un pulse d’ O_3 . Dans un second temps, nous avons recherché comment la régulation de ces canaux anioniques s’interface avec d’autres évènements précoces de signalisation induit par un stress O_3 ; la production de ROS, la variation de la concentration calcique cytosolique et la production d’hormones (1^{er} article). Nous nous sommes aussi intéressé à l’éventuel implication de l’acide oxalique (2^{ème} article) ; en effet, le pool d’ascorbate constitue la deuxième barrière de défense aux ROS produit lors d’un stress à l’ozone, et sa dégradation conduit, entre autres, à la production d’acide oxalique (Green & Fry, 2005). Or, à fortes concentrations, cet acide est connu pour induire une PCD chez les cellules en culture d’*Arabidopsis* (Errakhi et al., 2008). Dans les deux articles suivants, nous montrons que l’activation des canaux anioniques est impliquée dans la réponse à l’ozone et peut être activé par différentes voies. Cette activation précoce est un évènement majeur menant à la PCD.



2.2 Increased Anion Channel Activity is an Unavoidable Event in Ozone-induced Programmed Cell Death.

Article 1 : Takashi Kadono*, Daniel Tran*, Rafik Errakhi, Takuya Hiramatsu, Patrice Meimoun, Joël Briand, Mari Iwaya-Inoue, Tomonori Kawano, François Bouteau.

Article publié dans PLoS One 5(10): e13373. doi:10.1371/journal.pone.0013373

Ma contribution fut de compléter les résultats préliminaires obtenus par différentes personnes passées dans l'équipe puis de prendre en charge les approches d'électrophysiologie, les aspects concernant la génération rapide de ROS et les expériences sur les VPE.

Increased Anion Channel Activity Is an Unavoidable Event in Ozone-Induced Programmed Cell Death

Takashi Kadono^{1,2,9}, Daniel Tran^{1,9*}, Rafik Errakhi¹, Takuya Hiramatsu³, Patrice Meimoun¹, Joël Briand¹, Mari Iwaya-Inoue², Tomonori Kawano^{1,3}, François Bouteau^{1,3}

1 Laboratoire d'Electrophysiologie des Membranes, Université Paris Diderot-Paris 7, Institut de Biologie des Plantes, Bât 630, Orsay, France, **2** Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, Japan, **3** Graduate School of Environmental Engineering, University of Kitakyushu 1-1, Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu, Japan

Abstract

Background: Ozone is a major secondary air pollutant often reaching high concentrations in urban areas under strong daylight, high temperature and stagnant high-pressure systems. Ozone in the troposphere is a pollutant that is harmful to the plant.

Principal Findings: By exposing cells to a strong pulse of ozonized air, an acute cell death was observed in suspension cells of *Arabidopsis thaliana* used as a model. We demonstrated that O₃ treatment induced the activation of a plasma membrane anion channel that is an early prerequisite of O₃-induced cell death in *A. thaliana*. Our data further suggest interplay of anion channel activation with well known plant responses to O₃, Ca²⁺ influx and NADPH-oxidase generated reactive oxygen species (ROS) in mediating the oxidative cell death. This interplay might be fuelled by several mechanisms in addition to the direct ROS generation by O₃; namely, H₂O₂ generation by salicylic and abscisic acids. Anion channel activation was also shown to promote the accumulation of transcripts encoding vacuolar processing enzymes, a family of proteases previously reported to contribute to the disruption of vacuole integrity observed during programmed cell death.

Significance: Collectively, our data indicate that anion efflux is an early key component of morphological and biochemical events leading to O₃-induced programmed cell death. Because ion channels and more specifically anion channels assume a crucial position in cells, an understanding about the underlying role(s) for ion channels in the signalling pathway leading to programmed cell death is a subject that warrants future investigation.

Citation: Kadono T, Tran D, Errakhi R, Hiramatsu T, Meimoun P, et al. (2010) Increased Anion Channel Activity Is an Unavoidable Event in Ozone-Induced Programmed Cell Death. PLoS ONE 5(10): e13373. doi:10.1371/journal.pone.0013373

Editor: Edward Newbigin, University of Melbourne, Australia

Received: June 29, 2010; **Accepted:** September 20, 2010; **Published:** October 13, 2010

Copyright: © 2010 Kadono et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The study was supported by MESR (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) to LEM. Takashi Kadono gratefully acknowledges the financial support from the Japan Society for the Promotion of Science (** <http://www.jps.go.jp/english/e-pd/pddc.htm>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: daniel.tran@univ-paris-diderot.fr

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Ozone produced by a complex series of photochemical reactions from primary precursor emissions of nitrogen oxide and volatile organic compounds, is a major secondary air pollutant. Chronic exposures to low O₃ concentrations have a negative impact on crop yields by reducing photosynthesis and growth, and inducing premature leaf senescence in sensitive plants [1]. Acute transient O₃ exposures cause cell death, visible as O₃ lesions in the leaves [2] that resemble a programmed cell death (PCD) associated with the hypersensitive response (HR) in plant-pathogen interactions [3,4,5]. The primary site of O₃ interaction within plant cells is the apoplast where O₃ challenges the antioxidant protection of the cell. Accordingly, O₃ sensitivity generally correlates with the ascorbate status of the apoplast, which is an important signal initiation point [6]. Ozone also breaks down into various reactive oxygen species (ROS) namely hydrogen peroxide, singlet oxygen and hydroxyl radicals [6]. A quick burst

of ROS produced by plant cells is also induced by high concentrations of O₃ [3] and it resembles the oxidative burst of the HR in incompatible plant-pathogen interactions [7]. In plants, an exposure to O₃, also leads to a rapid increase in cytosolic free calcium ([Ca²⁺]_{cyt}) [8,9,10]. This increase in cytosolic Ca²⁺ concentration is sensitive to Ca²⁺ chelators, ion channel blockers, and ROS scavengers thus suggesting that calcium influx from the apoplast acts as a secondary messenger initiating oxidative cell death [4,10] in addition to rapid changes in the protein phosphorylation pattern [11]. The production of ROS finally leads to a PCD characterized by the early release of cytochrome c from mitochondria, activation of proteases, DNA fragmentation, electrolyte leakage and ultrastructural changes characteristic of PCD [3,4,5,10]. Responses that follow the O₃ challenge also include changes in gene expression and protein synthesis, and an accumulation of plant stress hormones, ethylene, salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) [4,12,13,14,15,16], that regulate the induction and spreading of the

oxidative stress symptoms [3,14,17,18]. Treatment with O₃ also induces a rapid accumulation of NO, which could coincide with the formation of HR-like lesions, suggesting that NO is also an important signalling molecule in the plant response to O₃ [19].

Anion channels play fundamental roles in key biological processes including plant cell response to environmental stresses [20,21,22]. Several types of anion channel differing in their voltage dependence, kinetic properties and anion selectivity have been characterized, mostly by electrophysiological techniques. R-type anion channel activation is an essential step of the ROS-dependent innate immune response in *Arabidopsis* suspension cells [23]. In the same model system, ROS generation and change in [Ca²⁺]_{cyt} participate to ABA-induced anion channel regulation [24,25,26]. Recently, an anion channel SLAC1 [27,28,29,30,31] was shown to be essential for stomatal closure in response to ozone, Ca²⁺ ions and H₂O₂ in *Arabidopsis* [31], suggesting that anion efflux could be induced in guard cells by O₃ through an increase in anion channel activity. Anion effluxes are also amongst the earliest responses observed in plant cells following recognition of pathogenic signals. For instance, cryptogein induces a rapid and massive activation of anion channel mediated nitrate efflux regulated by Ca²⁺-dependent events [32,33]. This NO₃⁻ efflux was shown to be necessary for the mediation of the cryptogein-induced oxidative burst, the induction of defence-related genes and the development of the HR. In this model, NO₃⁻ efflux was also shown to promote the accumulation of transcripts encoding vacuolar processing enzymes (VPEs) [33], a family of proteases showing caspase-1 activity [34] and reported to contribute to the disruption of vacuole integrity observed during the HR [35]. Anion channel regulation was also shown to be an essential component of harpin- and oxalic acid-induced plant PCD [36,37]. The involvement of anion channels as a critical component of the cell death process in plants is similar to their key role in animal apoptosis. Indeed, several studies have reported that in various types of mammalian cells, the activation of a plasma membrane Cl⁻ channel is an early prerequisite to apoptotic events including cell shrinkage (termed AVD for apoptotic volume decrease), cytochrome c release, the activation of proteases (including caspases) and nucleases and, ultimately, cell death [38,39]. Taken together, these data suggest that anion channel activation is not a passive secondary feature of plant responses to stress, but a driver of these processes.

Recent research has shown that the similarity of O₃-induced cell death and hypersensitive cell death is not only external [2,40] since these phenomena also share many physiological and molecular features [3,11]. Therefore, we have analyzed the role of anion channels in O₃-induced cell death signalling pathways using *Arabidopsis thaliana* cells as a model. It was found that an O₃ challenge induced the activation of a plasma membrane anion channel which was an early prerequisite of O₃-induced cell death in *A. thaliana*. This oxidative cell death was mediated by the interplay of anion channel activation, Ca²⁺ influx, ROS generation and included an increase in VPE transcripts. Furthermore, ABA and salicylic acid appear to participate to this anion channel activation leading to O₃-induced cell death.

Results

O₃-induced cell death in *A. thaliana* suspension-cultured cells

We first checked if O₃ induced cell death in our model plant system by exposing *Arabidopsis* cell cultures to a pulse of ozonized air. Vacuole shrinkage was observed which led to completely collapsed cells and finally cell death as determined by Evans blue

or neutral red staining (Figure 1A). The percentage of dead cells reached a plateau about 2 h after O₃ treatment (Figure 1B), the degree of cell death being dependent on O₃ treatment duration, with about 50% and 80% of dead cells detected 2 h after a 3 min and a 10 min O₃ treatment, respectively (Figure 1B). The number of dead cells was similar when quantified by the fluorescein diacetate (FDA) spectrofluorimetric method (Figure 1C). In order to check whether this O₃-induced cell death was due to an active mechanism requiring active gene expression and cellular metabolism, *A. thaliana* cell suspensions were treated with actinomycin D (AD), an inhibitor of RNA synthesis, or with cycloheximide (Chx), an inhibitor of protein synthesis, at 20 µg.mL⁻¹ each, 15 min prior to O₃ exposure. Actinomycin D and Chx significantly reduced the O₃-induced cell death (Figure 1D). These results indicated that this cell death required active cell metabolism, namely gene transcription and *de novo* protein synthesis. Fragmentation of nuclear DNA was observed by agarose gel analysis of DNA extracted from cell suspensions after a 10 min treatment with O₃ (Figure 1E). This DNA fragmentation was also dependent on active gene expression and *de novo* protein synthesis since it was not detected after the addition of AD or Chx to the suspension cell cultures (Figure 1E). Taken together, these data confirm that O₃ induced a PCD in *A. thaliana* cells.

Activation of anion channels is a crucial early event in O₃-induced cell death

Cell shrinkage is a major hallmark of PCD. This process may be mediated by a net efflux of water resulting from the release of anions and K⁺. Indeed, anion efflux, detectable as a current increase, has been reported to be a necessary event to achieve cell death in suspension cells subjected to either cryptogein [33] or oxalic acid [37]. Since ozone induced cell shrinkage (Figure 1A), an electrophysiological approach was undertaken to determine the role of O₃ on cell membrane potential and on anion currents. Two protocols were used to assess the O₃ effect on cell polarization: (i) free-running PM potential time-courses were recorded in cells exposed to ozonized air (Figure 2A) and (ii) the mean PM potentials of cell populations exposed to ozonized air for 3 or 10 min were compared to those of cells pretreated by air alone during 10 min (Figure. 2B). The value of the resting membrane potential (V_m) of control cells (air treated or without treatment) were similar, -34.8±1.5 mV (n=23) and -35.3±1.4 mV (n=22) respectively and in the same range of previous studies [26,41,42,43,44]. A rapid depolarization of the cell PM in response to ozonized air was detected with the first protocol (Figure 2A). Accordingly, 3 or 10 min O₃-exposed cells showed a depolarized PM compared to cells treated with air. The amplitude of the observed PM depolarization depended on the duration of the O₃ treatment (Figure 2B). Previous electrophysiological studies and pharmacological analyses identified a current displaying the characteristics of anion channels in the PM of *A. thaliana* cells [24,41]. This current was shown to be sensitive to structurally unrelated anion channel inhibitors, 9-anthracen carboxylic acid (9-AC) and glibenclamide (gli) [24,42]. It presented features of slow anion channels [41], slow activation upon hyperpolarization and slow deactivation upon depolarization [45], although part of the instantaneous current could have been carried out by fast activating anion channels as described for guard cells [46]. Since long hyperpolarizing or depolarizing voltages could artificially modify the ionic content of our living cells, we recorded the signature of this current using shorter voltage pulses [41]. In accordance to the PM depolarization, O₃ induced an increase of anion current after 4 min (Figure 2C). A current showing the features of slow anion channels and a sensitivity to glibenclamide

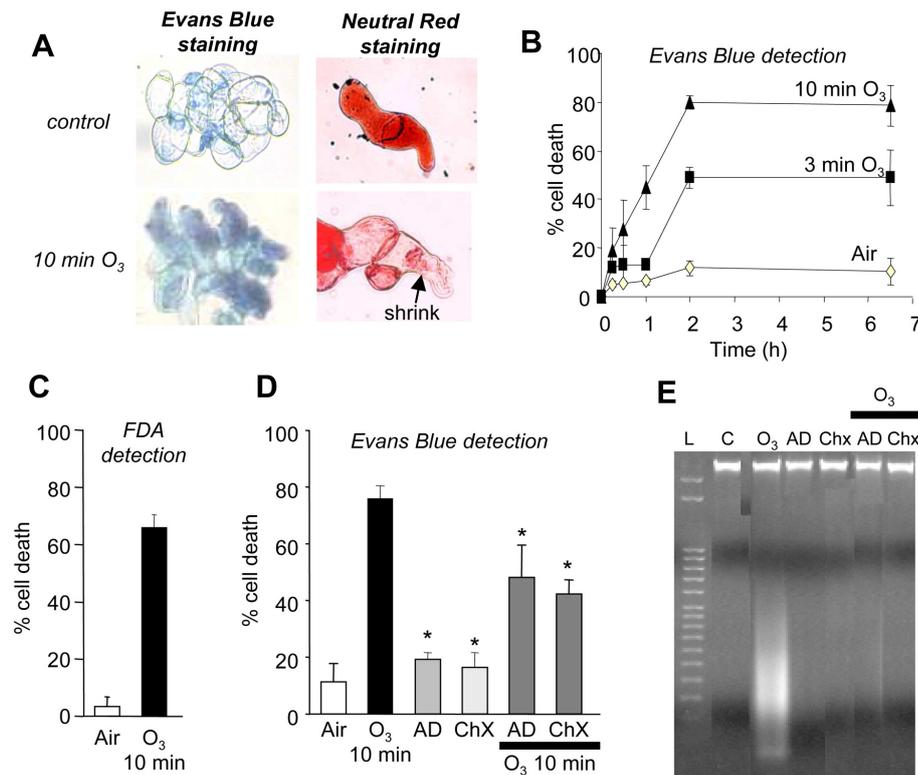


Figure 1. O₃-induced cell death in *A. thaliana* suspension cultured cells. **A.** Light micrographs of ozone-treated *A. thaliana* cells stained with Evans Blue or Neutral Red. Cells were exposed 10 min to ozonized air and incubated for a further 6.5 h for development of cell death. **B.** Time-dependent development of O₃-induced cell death in *A. thaliana* cells. Cell death was induced by exposing the cell suspensions to a pulse of ozonized air lasting for either 3 or 10 min. Controls correspond to a 10 min pulse with air only. O₃-treated and pretreated cell suspensions (0.2 ml) were sampled and transferred to a 1.5 ml tube at the end of the O₃ exposure. For each treatment, cells were incubated for up to 6.5 h with samples taken at 0, 0.25, 0.5, 1, 2 and 6.5 h, for cell staining with Evans blue and subsequent counting. **C.** Cell death extent detected by the FDA technique after 6 h. **D.** Effect of pretreatment with actinomycin D (AD, 20 μg/ml) or cycloheximide (Chx, 20 μg/ml) on ozone-induced cell death detected by Evans blue staining. The data correspond to means of at least 4 independent replicates and error bars correspond to SE. **E.** Fragmentation of nuclear DNA detected by gel electrophoresis after a 10 min exposure to ozonized air with or without either actinomycin D (20 μg/ml) or cycloheximide (20 μg/ml). Representative results from three independent experiments are shown. DNA molecular weight markers (bp) are shown on the left (lane L). doi:10.1371/journal.pone.0013373.g001

was also detected when cells were exposed to O₃ (Figure 2D). When compared to air treated cells, the anion current amplitude increase depended on O₃ treatment duration (Figure 2E), reaching 200% of the mean control value of -1.17 ± 0.05 nA ($n = 21$). The increase in anion current, that correlated to the PM depolarization amplitude (Figure 2B), might explain the depolarization induced by O₃ since pretreatment of cells with gli or 9-AC (200 μM) drastically reduced the O₃-induced depolarization and anion current increase (Figure 2F–G). Therefore, the effect of anion channel blockers on the extent of O₃-induced cell death was tested. Ozone (10 min treatment) induced around 80% of cell death within 6 h (Figure 1B–C). When treated with anion channel blockers, gli or 9-AC (200 μM), cell death was reduced by approximately 50% (Figure 2H). These results suggested that the anion current increase was a required upstream event in the signaling pathway leading to O₃-induced cell death.

Ozone- induced calcium influx

Increases in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in response to O₃ have been reported previously in Arabidopsis seedlings [4,8,9] and in tobacco cells [10]. Moreover, addition of Ca²⁺ chelators or Ca²⁺ channel blockers resulted in a significant inhibition of an O₃-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase and subsequent cell death suggesting that the

uptake of extracellular Ca²⁺ via the activation of PM Ca²⁺ channels is required for the induction of active cell death [4,10]. A change in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ was detected in Arabidopsis cells expressing aequorin in response to O₃, as shown in Figure 3A. The observed changes in aequorin luminescence were biphasic, consisting of an immediate small increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ immediately after the initiation of O₃ exposure that was followed by a larger increase when O₃ exposure was stopped (Figure 3A). This increase is maintained and reached a plateau after 50 min (data not shown). The Ca²⁺ channel blocker, La³⁺ (500 μM) inhibited the second phase of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase after O₃ exposure (Figure 3B), indicating that the influx of extracellular Ca²⁺ into the cells was via an activation of Ca²⁺ channels. Addition of 500 μM La³⁺ also resulted in the significant inhibition of O₃-induced cell death (Figure 3C). Similarly, addition of 1 mM BAPTA, a membrane-impermeable Ca²⁺ chelator that is active at a physiological pH range, resulted in the inhibition of O₃-induced cell death (Figure 3C). These results suggested that the uptake of extracellular Ca²⁺ was also required for cell death induction in *A. thaliana* cells. We thus tested the effect of BAPTA and La³⁺ on the O₃-induced increase in anion current and the subsequent cell depolarization. Pretreatment with BAPTA or La³⁺ significantly lowered the O₃-induced depolarization and increase in anion

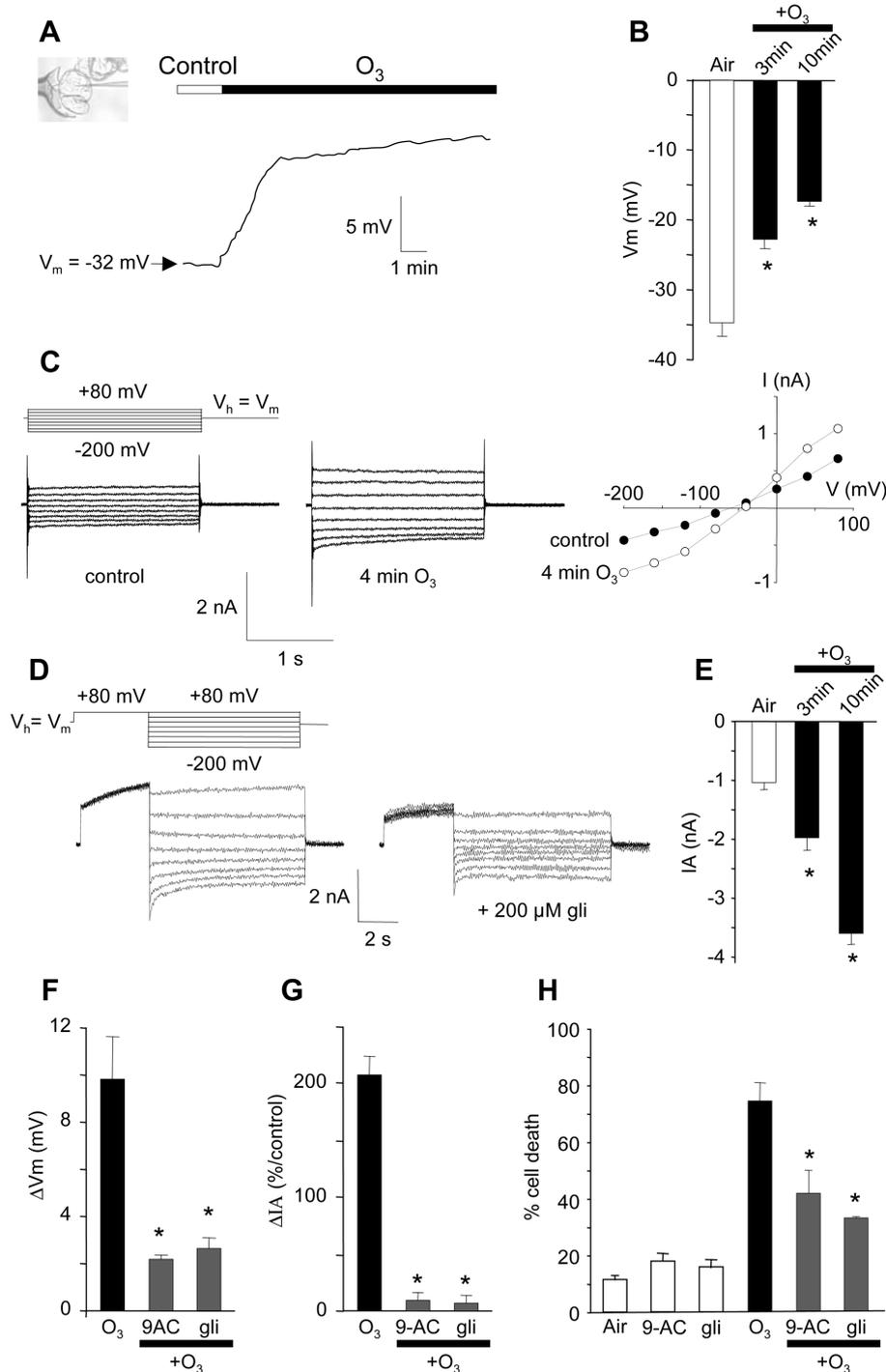


Figure 2. Ozone-induced depolarization and anion current increase of *A. thaliana* cells. **A.** Typical depolarization of an *Arabidopsis thaliana* cultured cell observed in response to O₃ exposure. Inset, *A. thaliana* cell maintained by a microfunnel and impaled on a microelectrode. **B.** Mean values of plasma membrane (PM) potentials recorded after a pulse of ozonized air lasting 3 or 10 min or after a 10 min air pulse. **C.** Anion currents measured under control conditions and 4 min after O₃ exposure. The protocol was as illustrated, holding potential (V_h) was V_m. Corresponding current-voltage relationships at 1.8 s. **D.** Anion currents showing slow activation, slow deactivation recorded after an ozone treatment. Decrease of current intensity by glibenclamide (200 μM) using the indicated protocols. **E.** Mean values of corresponding anion currents (recorded at -200 mV and 1.8 s) after the pulse of ozonized air lasting 3 or 10 min or after a 10 min air pulse. **F.** Mean values of depolarization recorded after 3 min exposure to O₃ with or without anion channel blockers (200 μM 9-anthracen carboxylic acid (9-AC) or 200 μM glibenclamide (gli)). **G.** Mean steady state values of corresponding anion currents recorded at -200 mV and 1.8 s with or without 200 μM 9-AC in the medium. Current variations are given as a percentage of the control level before O₃ exposure. Data correspond to mean values ± SD of at least six independent experiments. **H.** Effect of pretreatment with 9-AC or gli (200 μM each) on O₃ induced-cell death. Cell death was induced by exposing the cells to ozonized air for 10 min. For development of cell death, cells were incubated for a further 6 h after O₃ exposure. The data correspond to means of at least 4 independent replicates and error bars correspond to SE. doi:10.1371/journal.pone.0013373.g002

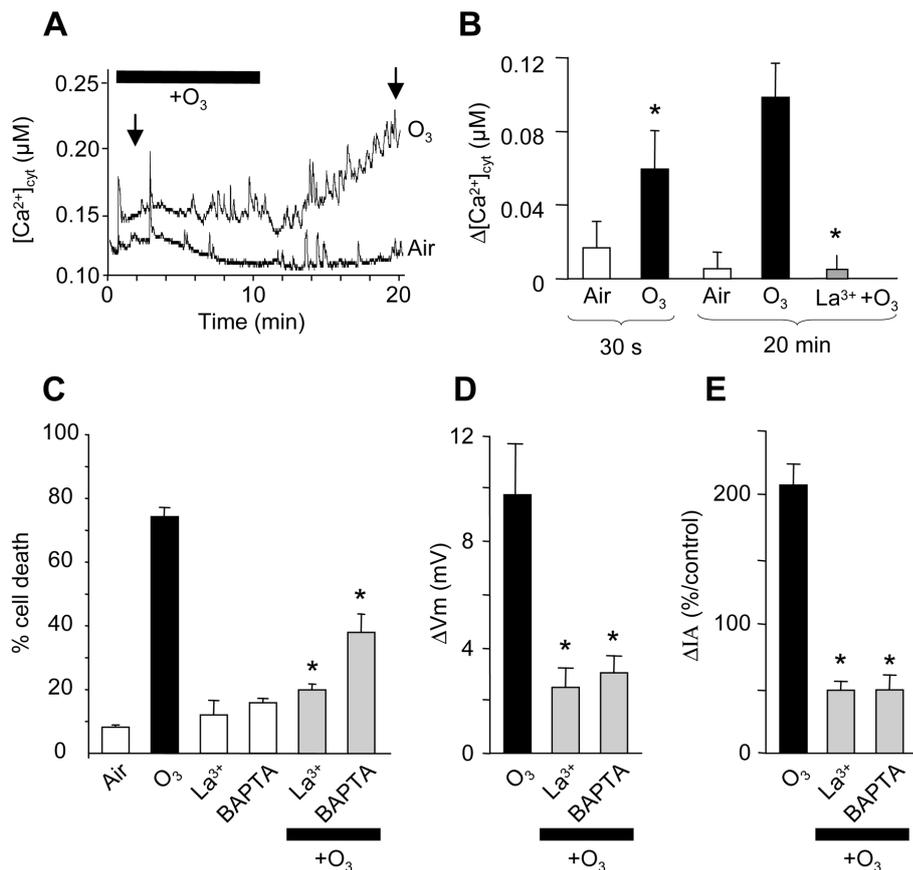


Figure 3. Ozone induced variations of Ca²⁺ in *A. thaliana* cells. **A.** A typical [Ca²⁺]_{cyt} variation of an aequorin expressing *Arabidopsis thaliana* cell in response to O₃. **B.** Mean values of [Ca²⁺]_{cyt} variation after 30 s and 20 min (arrows in (A)) with or without La³⁺ (500 μM). **C.** Impact of BAPTA (1 mM) or La³⁺ (500 μM) on O₃-induced cell death. Cell death was induced by exposing the cells to ozonized air for 10 min. For development of cell death, cells were incubated for a further 6 h after O₃ exposure. Prior to O₃ exposure, cell suspensions were treated with BAPTA (1 mM) or La³⁺ (500 μM). Evans blue stained cells were counted for each treatment. Data reflect the mean and SE of at least four independent experiments. **D.** Mean values of depolarization recorded after 3 min exposure to O₃ with or without BAPTA or La³⁺. **E.** Mean steady state values of the corresponding anion currents recorded at -200 mV and 1.8 s with or without BAPTA or La³⁺. Current variations are given as a percentage of the control level before O₃ exposure. Data correspond to mean values ± SD of at least six independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0013373.g003

current (Figure 3D–E). These results suggested that an increase in [Ca²⁺]_{cyt} was also an early upstream event in the signaling pathway leading to O₃-induced cell death in *A. thaliana* cells, and also suggested the involvement of the anion current increase in this signaling pathway.

Effects of ROS scavengers

The generation of ROS, such as superoxide anions (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂) by O₃ degradation in the apoplast, is a recognized mechanism involved in O₃-induced damage [6,11]. Addition of ROS scavengers or chelators was shown to inhibit O₃ induced cell death, indicating that singlet oxygen (¹O₂), and H₂O₂ generated from O₂⁻ by superoxide dismutase play central roles in acute O₃-induced damage to tobacco cells [10]. We thus checked the effect of DABCO (a strong and selective scavenger of ¹O₂), tiron (a scavenger of O₂⁻) and diphenylpicrylhydrazolium chloride (DPI, an inhibitor of the NADPH-oxidase), on O₃-induced ROS generation. ROS generation was monitored by *Cypridina* luciferin analog (CLA) chemiluminescence which reports the presence of both O₂⁻ and ¹O₂ (but to a lesser extent). Exposure of *Arabidopsis* cells to O₃ resulted in a biphasic enhancement of the CLA-

chemiluminescence yield (Figure 4A). An initial increase peaked at about 1 min while a second peak was observed at about 5 min. Since CLA is responsive to both O₂⁻ and ¹O₂, tiron, DPI and DABCO were used to determine which ROS was involved [47]. Pretreatment of the cells with DABCO (5 mM) allowed a significant decrease of the first peak while the 2nd peak remained unchanged (Figure 4A). Pretreatment of the cells with DPI (50 μM) or tiron (5 mM) failed to effect the first peak but drastically decreased the second peak of CLA-chemiluminescence (Figure 4A). Therefore, the first rapid chemiluminescence increase in the presence of CLA appeared to reflect the production of ¹O₂ (inhibited by DABCO), while a delayed production of O₂⁻ (possibly converted to H₂O₂) is supported by the action of tiron and DPI (inhibition of the 2nd peak). The effect of DABCO, tiron, and DPI on O₃-induced *A. thaliana* cell death was also analysed after the cell suspensions were treated with DABCO (5 mM), tiron (5 mM) or DPI (50 μM) five minutes prior to O₃ exposure. The O₃-induced cell death was significantly reduced in the presence of DABCO, tiron and DPI (Figure 4B). Taken together, ROS generation is a likely component of the pathway leading to O₃-dependent damage of *A. thaliana* cells, as previously suggested for tobacco and *Arabidopsis* seedlings [10,48].

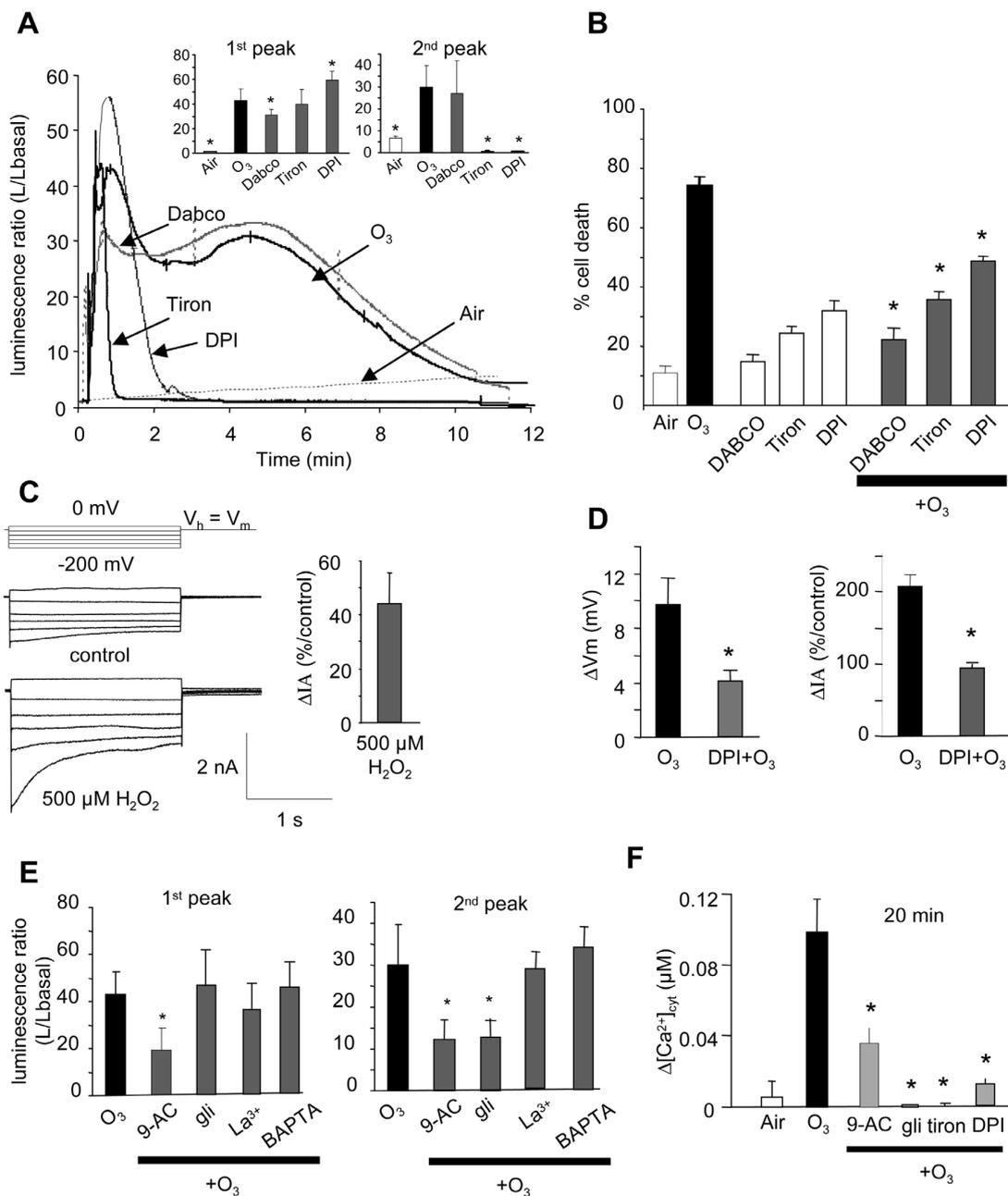


Figure 4. Ozone induced ROS generation in *A. thaliana* cells. **A.** Typical early biphasic ROS generation in *Arabidopsis thaliana* cells in response to O₃ with or without DABCO (5 mM), tiron (5 mM), or DPI (50 μM). Inset showing the mean values of ROS generation for the first and 2nd peaks. **B.** Cell death was induced by exposing cells to ozonized air for 10 min. For development of cell death, cells were incubated for a further 6 h after O₃ exposure. Prior to O₃ exposure, cell suspensions were treated with DABCO (5 mM), tiron (5 mM), or DPI (50 μM). Evans blue stained cells were counted for each treatment. Data reflects the mean and SE of 4 independent experiments. **C.** Anion currents measured under control conditions and 4 min after 500 μM H₂O₂ addition. The protocol was as illustrated, holding potential (V_h) was V_m. Mean current variations are given as a percentage of the control level before H₂O₂ addition. Data correspond to mean values ± SD of at least six independent experiments. **D.** Mean values of depolarization recorded after 3 min exposure to O₃ with DPI 50 μM and mean steady state values of the corresponding anion currents recorded at -200 mV and 1.8 s with DPI. Current variations are given as a percentage of the control level before O₃ exposure. **E.** Mean values of ROS generation for the 1st and 2nd peaks in response to O₃ with or without 9-AC or gli (200 μM each), La³⁺ (0.5 mM) or BAPTA (1 mM). **F.** Mean values of [Ca²⁺]_{cyt} variation after 20 min with or without 9-AC (200 μM), gli (200 μM), tiron (5 mM) or DPI (50 μM). Data correspond to mean values ± SE of at least six independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0013373.g004

Since (i) influx of Ca²⁺ could act upstream of the O₃-induced activation of anion channels (Figure 4E) and (ii) H₂O₂ was shown to activate PM Ca²⁺ channels [49] and increase [Ca²⁺]_{cyt} in our

model [25], we further tested whether H₂O₂ could activate anion channels. Indeed, application of 500 μM H₂O₂ induced an increase in anion current (Figure 4C) suggesting that O₃-induced

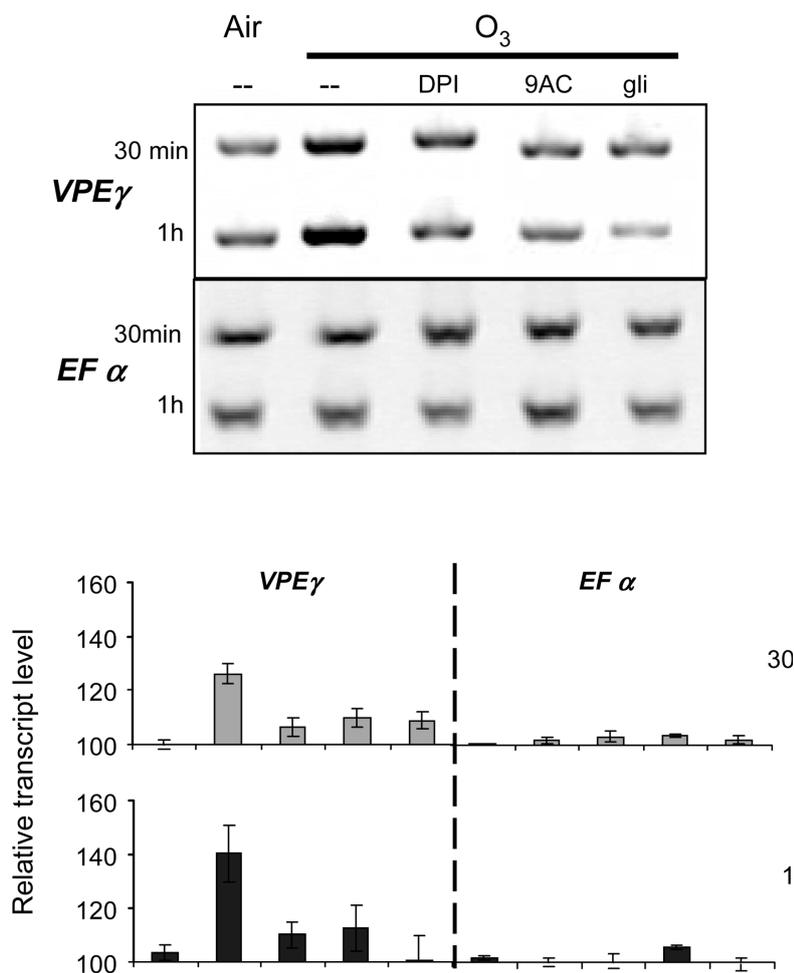


Figure 5. Effect of ozone on vacuolar processing enzyme gene transcription. The effect of a 10 min pulse of ozonized air on the transcription of a vacuolar processing enzyme (VPE) gene, encoding a caspase-like protein. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with RNA extracted 30 min and 1 h after the ozone pulse with or without DPI (50 μ M), 9-AC or gli (200 μ M each). EF α 4 was used as a housekeeping gene. Relative transcript level in different conditions. Quantitative evaluations were based on signal intensity analysed with ImageJ, and expression level of EF α 4 gene was used for calibration (=100). Results are means \pm S.D. for three biological replicates. doi:10.1371/journal.pone.0013373.g005

O₂⁻ and subsequent H₂O₂ production could participate via Ca²⁺ influx to the O₃-induced activation of anion channels. As expected from above data, pretreatment of cells with 50 μ M DPI, thus blocking the O₃-induced H₂O₂ generation (Figure 4A), significantly decreased the O₃-induced depolarization and increase in anion channel activity (Figure 4D). The anion channel blockers gli and 9-AC (200 μ M) were also found to be capable of decreasing the CLA luminescence increase observed upon O₃ challenge (Figure 4E). Glibenclamide led to a decrease of only the second peak of O₃-induced CLA-luminescence where as 9-AC decreased both peaks. Calcium channels blocker lanthanum or chelator BAPTA failed to decrease rapid ROS generation (Figure 4E). As a whole, these data suggested a complex interplay between anion channel regulation, Ca²⁺ influx and H₂O₂ production in response to O₃. We thus checked if incubation, prior O₃ exposure, with anion channel blockers (gli or 9-AC) or with the O₂⁻ scavenger tiron and DPI could impact on O₃-induced [Ca²⁺]_{cyt} increase. Effectively, anion channel blockers as H₂O₂ pharmacology (tiron and DPI) could reduced the late increase of cytosolic calcium

(Figure 4F) confirming thus the interplay between anion channel regulation, Ca²⁺ influx and H₂O₂ production in response to O₃.

The O₃-induced anion channel activation participates in vacuolar processing enzyme (VPE) gene expression

In mammalian cells undergoing AVD, the ion loss triggers activation of specific proteases [38]. Based on these data and on our finding that anion channel activity is involved in mediating vacuole shrinkage and O₃-triggered cell death (Figure 1), we investigated whether the O₃-induced anion efflux could be a key event in a signaling cascade leading to protease activation. Therefore, a putative role for the anion efflux in mediating the accumulation of mRNA encoding VPEs was investigated. This protease family has been shown to be essential for HR induction in tobacco challenged by pathogens [34,50], and their transcription is dependent on anion efflux in response to cryptogein [33]. Four VPE genes have been identified in Arabidopsis, namely VPE α , VPE β , VPE δ , and VPE γ [51]. To investigate the involvement of VPEs in O₃-induced effects, we analyzed VPE mRNA accumu-

lation in O₃-treated cells by RT-PCR. Transcripts for *VPEα*, *VPEβ* and *VPEδ* were not detected in our model system (data not shown) however, the mRNA level of *VPEγ* increased in response to O₃ with the changes rapidly occurring within 30 min (Figure 5) thus supporting the idea that VPEs participate in O₃-induced damage in Arabidopsis. When Arabidopsis cells were treated with gli, 9-AC or DPI before the O₃ challenge, accumulation of *VPEγ* transcript was reduced (Figure 5). Therefore, anion channel activation and H₂O₂ generation could be involved in the pathway leading to a transcriptional regulation of *VPEγ* transcripts.

Hormones and anion channels in response to O₃

Since the plant hormones SA, JA, ABA and ET as well as NO are involved in determining the duration and extent of O₃-induced cell death and its propagation [3,11,19,52], their impact was checked in our model system. Ozone-induced cell death was analysed in suspension cells generated from NahG, cpr5 and npr1 plants, which are impaired in SA signalling, the sid2 mutant, which is impaired in SA synthesis through the isochorismate pathway, and the JA-resistant mutant jar1-1. For ethylene, ABA and NO, pharmacological approaches were undertaken with (i) aminooxyacetic acid (AOA), an inhibitor of ACC synthase [53], and alpha-aminoisobutyric acid (AIB), an inhibitor of ACC oxidase [54] for ET, (ii) fluridon an inhibitor of ABA synthesis [55] and (iii) PTIO, a scavenger of NO [56]. Ozone-induced cell death levels recorded after pretreatment of the cells with AOA, AIB and PTIO or with the jar1-1 cell line were not significantly different from that after O₃ treatment alone in Col-0 background (Figure 6A), indicating that JA, ET and NO are not major actors in the signalling pathways leading to O₃-induced cell death in Arabidopsis cultured cells. On the other hand, ABA synthesis appeared to take place in response to O₃ since pretreatment of cells with fluridon counteracted the O₃ effect (Figure 6A). In a similar manner, the O₃-induced cell death extent in the NahG, cpr5 and npr1 cell lines showed significant decreases (Figure 6B), revealing that O₃-induced death depended on SA signalling in Arabidopsis cultured cells. Interestingly, the sid2 cell line showed the same degree of O₃ induced cell death as the wild-type Col-0 line (Figure 6B) suggesting that SA synthesis via the isochorismate pathway was not required for cell death induction in our cells.

As relatively high concentration of SA could be rapidly released in the apoplast from the storage form salicylic acid-glucoside (SAG) [57,58], we tested the putative impact of SA on anion channel activation. Salicylic acid at 200 μM, a physiological concentration, induced a slight but rapid hyperpolarisation of the cells followed by a large depolarisation within a few minutes (Figure 6C–D). This biphasic regulation of the PM potential was accompanied by the biphasic regulation of anion channel activity, the delayed depolarization being correlated with an increased anion channel activity (Figure 6E–F). Thus, SA is not responsible for the early depolarization induced by O₃ but it could participate to the anion channel-mediated depolarization in a delayed manner.

Discussion

In this study we demonstrated that an acute exposure of Arabidopsis cells to ozone induced a controlled cell death displaying nuclear DNA fragmentation that required active gene expression and *de novo* protein synthesis. However, a typical laddering as previously reported in O₃ treated tobacco leaves [5] was not observed. Ozone-induced cell death was only partially decrease by AD or Chx treatment whereas no DNA fragmentation was detected when cells were pretreated with these chemicals.

Thus, we can not exclude that a small proportion of the cell death observed could be due to non active process. However, O₃ also induced cell shrinkage, another hallmark of the PCD process in both plant and animal cells [35,59]. These data fulfill the widely accepted criteria for PCD and confirm that our model responds to acute O₃ exposure in the same way as previously described for other plants [3,4,5,10].

We analyzed the putative role of anion channels in O₃-induced cell death signalling pathways by using the microelectrode voltage clamp technique which allows working on living cells with their cell wall. An increase in anion current and a depolarization of the PM were observed after treatment of cell suspensions with O₃. As previously discussed [24,41], the anion currents we recorded showed the characteristic kinetic features of S-type anion channels responsible for long-term anion efflux and depolarization in guard cells [60]. The addition, before an O₃ treatment, of 9-AC or glibenclamide, two structurally unrelated anion channel inhibitors was shown to be effective in *A. thaliana* suspension cells [37,42], strongly reduced the anion current and partially prevented the O₃-induced PM depolarization thus suggesting the participation of slow anion channel currents. Such a causal link has been described already with anion channel inhibitors which block blue light-induced depolarization [61] or toxin-induced depolarization [33,44]. Activation of rapid- and/or S-type anion channels by ABA has been shown also to lead to the PM depolarization of guard cells in *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* [60,62]. In guard cells the long-term anion efflux and sustained depolarization has mainly been attributed to the activity of S-type anion channels. This, together with our finding that O₃ induced anion currents displaying characteristic of slow type anion channels, suggests that the mechanism by which O₃ promotes PM depolarization resembles that occurring in guard cells. It is noteworthy that recently, SLAC1, which represents the slow type anion channel of guard cells [28,29], was shown to be essential for stomatal closure in response to O₃, Ca²⁺ and H₂O₂ [31]. However, our data are the first direct evidence that O₃ can regulate anion channel activity and that this anion current increase is an early prerequisite to the morphological and biochemical events participating to PCD. The activation of anion currents appeared to be important in the O₃ response since 9-AC and gli decreased the induced cell death. Involvement of ion release via anion flux modulation is also considered to be essential among the earliest responses of plant cells to avirulent pathogens or elicitors capable of inducing PCD [63]. Our data pointed out a critical role for anion channels in the signaling pathways leading to cell death. In various mammalian cell types, AVD, which is mediated by water loss caused by activation of anion channels and a K⁺ outward rectifying channel, is an early prerequisite to apoptotic events including cell shrinkage, cytochrome c release, activation of proteases (including caspases) and nucleases, and ultimately PCD [39,64]. Indeed, activation of outward K⁺ channels was reported in response to O₃ in guard cell protoplasts [63,65]. Thus, efflux of anions and K⁺ might drive water efflux leading to the observed cell shrinkage and death in response to O₃.

The involvement of ROS generation, increases in [Ca²⁺]_{cyt} and the crosstalk between these events in response to O₃ is now widely accepted [3,4,8,9,10,11]. Furthermore, variations in both ROS and [Ca²⁺]_{cyt} levels are involved in the regulation of anion channels in response to ABA in Arabidopsis cells [24,25]. In our model system, although the first rapid increase in [Ca²⁺]_{cyt} did not resemble that reported in Arabidopsis seedlings [9], the 2nd delayed increase was sensitive to La³⁺, thus suggesting that O₃ induced an influx through PM Ca²⁺ channels [8,9]. ROS generation was also detected in our experimental system. The

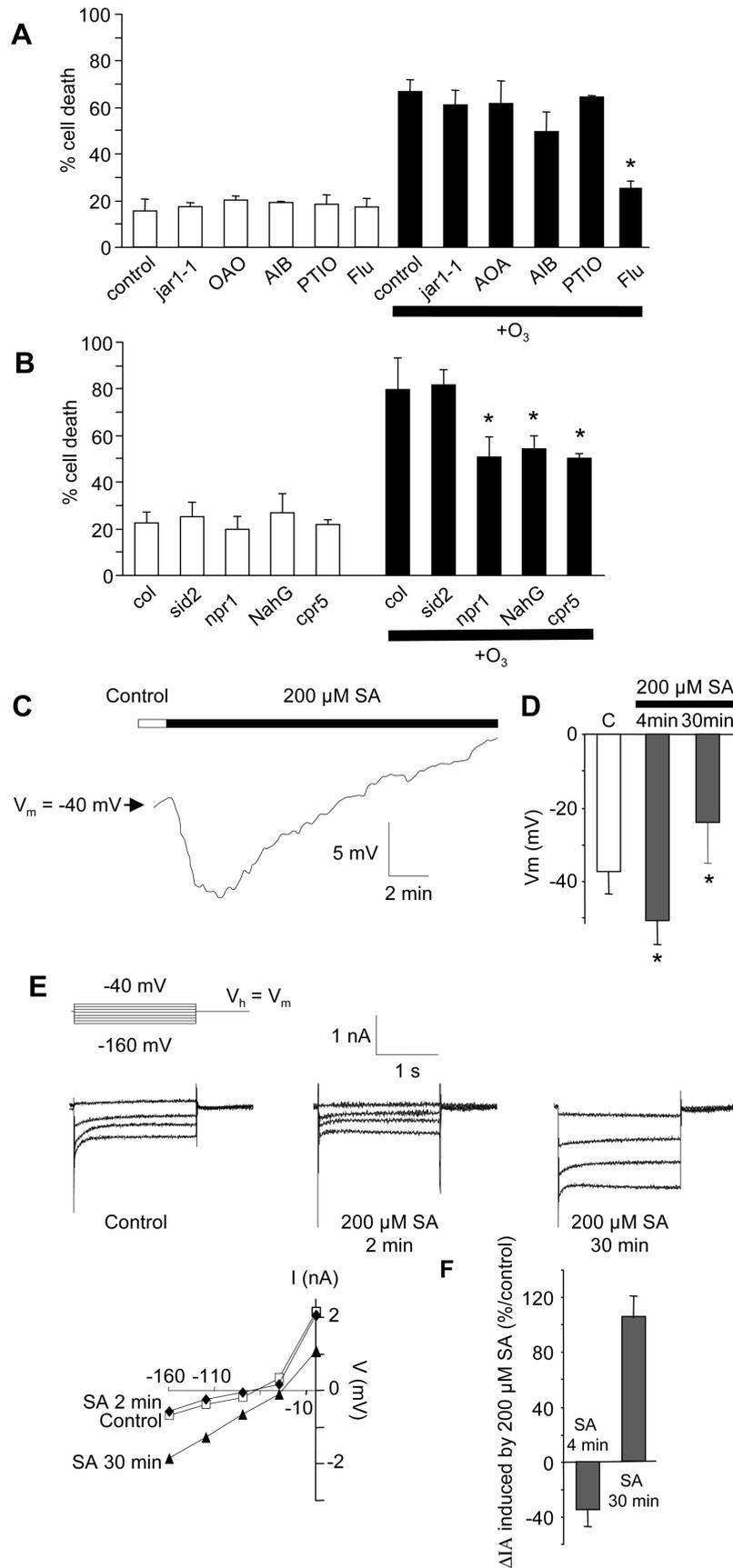


Figure 6. Role of hormone in O₃-induced cell death in *A. thaliana* cells. **A.** Ozone induced cell death in suspension cells generated from jar1-1, or wild type cells pretreated with PTIO (250 μM), a scavenger of NO, with 200 μM of aminooxyacetic acid (AOA), an inhibitor of ACC synthase, with 200 μM of alpha-aminoisobutyric acid (AIB), an inhibitor of ACC oxidase, or with 100 μM fluoridon (Flu), an inhibitor of ABA synthesis. **B.** Ozone induced cell death in suspension cells generated from NahG, cpr5, sid2 and npr1 plants. Cell death was induced by exposing the cells to ozonized air for 10 min. For development of cell death, cells were incubated for a further 6 h after O₃ exposure. The data correspond to means of at least 4 independent replicates and error bars correspond to SE. **C.** Time course of PM potential variation observed in response to 200 μM SA. **D.** Mean values of PM potential recorded 4 and 30 min after SA addition. **E.** Anion currents measured under control conditions, 4 and 30 min after addition of 200 μM SA. Protocols were as illustrated, holding potential (V_h) was V_m. Corresponding current-voltage relationships at 1.8 s. **F.** Mean current variations after SA addition given as a percentage of the control level before SA addition. Data correspond to mean values ± SD of at least six independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0013373.g006

impact of tiron and DPI strongly suggested that O₂⁻ and subsequently H₂O₂ were produced by NADPH-oxidase in response to O₃ as previously reported [16]. As expected from these data, a significant inhibition of O₃-induced cell death was found after addition of BAPTA, La³⁺, tiron or DPI [4,10]. These events appear to be linked to O₃-induced anion channel increase activity since we observed that H₂O₂, which induced an increase in [Ca²⁺]_{cyt} in our model [25] probably through PM Ca²⁺ channel activation [49], was also capable of increasing anion channel activity. Accordingly, the O₂⁻ scavenger tiron and NADPH-oxidase inhibitor DPI were able to decrease the late [Ca²⁺]_{cyt} variation. BAPTA and La³⁺ led to a decrease of the O₃-induced depolarization and anion channel activation in accordance with the sensitivity of PM anion currents to an increase in [Ca²⁺]_{cyt} [24,26] but have no effect on rapid ROS generation. Taken together, these data suggest that Ca²⁺ influx and ROS generation probably act upstream of anion channel regulation. However, the anion channel inhibitors gli and 9-AC were also shown to decrease O₃-induced O₂⁻ generation and [Ca²⁺]_{cyt} variation indicating a more complex interplay between ROS, Ca²⁺ and ion channel activation in signal transduction processes. A putative explanation might be that a first non biological ROS generation, from O₃ reacting with the ascorbate pool [6], induced the Ca²⁺ influx required for the activation of an anion channel. In turn, the Ca²⁺-activated anion channel and the ensuing PM depolarization possibly amplify the O₃ signal by activating a PM NADPH-oxidase as recently described in animal cells [66,67]. The H₂O₂ derived from the NADPH-oxidase activity then participates in the increase of [Ca²⁺]_{cyt} through the activation of PM Ca²⁺ channels [9,25,49] acting as a feedback loop on anion channel activation. This scenario is reminiscent of the activation of the oxidative burst in aequorin-transformed *Nicotiana tabacum* cells which was shown to be mediated by an anion channel-dependent increase in [Ca²⁺]_{cyt} [68,69]. However it is to be noted that this “wheel” of interplay (Figure 7) might be fuelled by several other entries such salicylic acid which could also fuel the generation of H₂O₂ and Ca²⁺ influx involved in O₃-induced cell death. SA-induced generation of ROS by cell wall peroxidases [70,71] and by NADPH-oxidase [58] is effectively known to lead to the Ca²⁺ influx, and this could explain the delayed increase in anion current observed in response to the application of exogenous SA. Active SA could be released from the inactive SAG pool in apoplast through SAGase action [58,72]. This could explain why the extent of cell death could be minimized after an O₃ challenge in SA-related signalling cell lines (NahG, cpr5 and npr1), while that cell death level in the sid2 mutant impaired in SA synthesis could not be. Our data clearly confirm that SA is involved in the amplification of O₃-induced cell death [4,16]. In the same way, ABA synthesis could also fuel this mechanism since this hormone is known to induce ROS generation, cytosolic Ca²⁺ increases and anion channel increases in Arabidopsis cells [25]. The impact of ABA on ion fluxes in response to O₃ is reminiscent of the ABA effect on stomata allowing sustained ion efflux leading to a decrease in cell volume.

This is in accordance with the recent observation that SLAC1 is essential for stomatal closure in response to ozone, ABA, Ca²⁺ ions, and H₂O₂ in Arabidopsis [31]. Thus, in our model SA release and ABA synthesis induced by O₃ could participate to sustain PM depolarization and anion effluxes leading to cell shrinkage.

The mitochondrial pathway was shown to be implicated in O₃-triggered PCD [5]. However, it did not appear to be linked to anion channel activation since glibenclamide which decreased the activation of O₃-induced anion channels, thus leading to less cell death failed to stop the O₃-induced Δψ_m (Figure S1). Nevertheless, DABCO, a ¹O₂ scavenger which decreased the ¹O₂ level and cell death in our model, inhibited the effect of O₃ on Δψ_m (Figure S1). The reaction of O₃ with ascorbate is known to lead to high yields of singlet oxygen [6] and therefore the detection of a rapid ¹O₂ production in response to O₃ was not a surprise. However, the involvement of ¹O₂ in O₃-induced cell death might not involve the same pathway as that induced by anion channels, thus reinforcing the idea that several different pathways leading to cell death are triggered in response to O₃. Further studies are needed to understand the role of ¹O₂ in O₃-induced cell death.

To further assess the mechanisms by which the anion current increase contributes to cell death, its participation in the transcriptional activation of VPEs identified as key players in plant PCD [73] was explored. VPE is a family of cysteine proteases which exhibit enzymatic properties similar to that of caspase-1, a cysteine protease involved in the PCD pathway in animals. Our study was based on the finding that O₃ induces protease activities [4,5] and that VPE transcript levels are dependent on anion channel mediated NO₃⁻ effluxes during cryptogei-induced cell death in tobacco [33]. Our results show that O₃ treatment up-regulates the expression of *VPEγ* and not the other Arabidopsis VPE-encoding genes. In the presence of 9-AC, glibenclamide or DPI, the accumulation of *VPEγ* transcripts was reduced. The activation of O₃-induced NADPH-oxidase and anion channels could thus be early prerequisites for *VPEγ* synthesis. Our data are in accordance with the fact that VPE activities can be increased by SA treatment and that expression of *VPEγ* is also transiently up-regulated during the early phase of HR activation [35,74], at judged by increased transcript levels. Although the VPE target(s) that mediates HR cell death is unknown, Hatsugai et al. [34] nevertheless observed a dramatic inhibition of vacuole collapse in VPE-suppressed plants. Thus a VPE-dependent disruption of vacuole integrity might be a crucial step in O₃-induced vacuolar shrinkage and cell death, as it is for some forms of HR cell death [33,34,73]. Therefore, anion channel activation might not be a passive secondary aspect of O₃-induced cell death, but an event that drives the whole process.

Plant hormones as well as NO are involved in determining the duration and extent of O₃-induced cell death and its propagation [3,11,19,52]. The extent of O₃-induced cell death with the JA-resistant mutant jar1-1 and cells treated with pharmacological agents that block ethylene or NO synthesis was similar to that

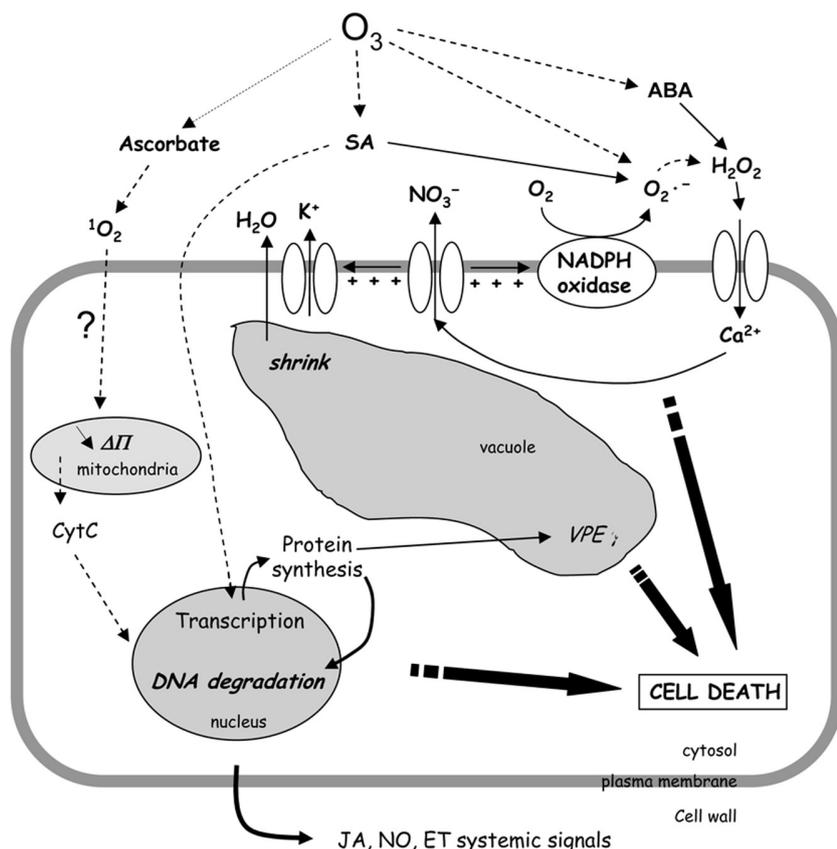


Figure 7. Hypothetical scheme for anion channel role in ozone signaling leading to cell death in *Arabidopsis thaliana* cells.
doi:10.1371/journal.pone.00113373.g007

observed in the wild type cell line. This suggested that in *Arabidopsis* suspension cells, JA, ET and NO were not involved in the development of O₃-induced PCD. It should be noted that methyl-jasmonate, jasmonic acid, diethylamineNONOate, used as an NO donor [56], or the ET generator aminocyclopropane carboxylate failed to increase anion channel activity under our experimental conditions (data not shown). However, our data are not in opposition with the involvement of JA and ET in determining the duration and extent of O₃-induced cell death and its propagation [3]. In the same way, NO might be needed to generate the intracellular signals required for the cell-to-cell spreading of an O₃-induced HR, but not necessary to induce a PCD [19]. In our experiments all of the cells were challenged by O₃, thus systemic messages could not impact on the degree of cell death. Our data are thus in accordance with a direct role for SA and ABA in O₃-induced cell death while JA, ET and NO probably act only in auxiliary signalling pathways, which stabilize and amplify the primary signal without excluding a role for SA and ABA in these auxiliary signalling pathways [3,11,75].

In summary, this work shows that anion channel activation is central to the signalling cascade leading to O₃ induced-cell death and provides evidence that anion movements are tightly correlated to the cellular and molecular events involved in this process. Indeed, anion channels are now recognized as important players in signaling pathways associated with plant cell responses to abiotic and biotic environmental stresses [21,22] and our findings highlight the notion that plants, like animals, use anion channels as components of cell death pathways.

Materials and Methods

Cell culture conditions

For this study, *Arabidopsis thaliana* L. cell line T87 [76] was used. Axelos et al. (1992) [76] have previously established a cell line (named T87) from the ecotype Columbia plant. Suspension cells have been shown to be a convenient model for identifying early physiological events induced by different biotic [32,37,42] and abiotic stress [10,77]. They show physiological responses to various stimuli, in a similar manner to autonomous cellular responses in intact tissues [78], especially the morphological features of dying cells during PCD [79], and thus allow the observation of events in each single cell or the real time behavioral monitoring of large populations of cells. *A. thaliana* suspension cells were grown in Gamborg or Murashige-Skoog medium (pH 5.8). They were maintained at 22±2°C, under continuous white light (40 μE m⁻² s⁻¹) and continuous shaking (gyratory shaker) at 120 rpm. Cell suspensions were sub-cultured weekly using a 1:10 dilution. All experiments were performed at 22±2°C using log-phase cells (4 days after sub-culture).

Preparation of *Arabidopsis* mutant or transgenic cell lines

For the cell suspension cultures derived from *Arabidopsis* mutants (*jar1-1*, *sid2-1*, *cpr5* and *npr1*) and transgenic lines (*NahG* and *apoaquorin*), the seeds of mutants and transgenic lines were sterilized in 1% (w/v) sodium hypochlorite and allowed to germinate on sterilized MS agar plates containing vitamin B5, but lacking 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). The seedlings

were grown on the agar plates under a 12/12 h light/dark regime at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ for three weeks. Excised tissues from harvested seedlings were transferred onto agar medium containing 0.2 mg/ml 2,4-D to promote callus formation. Suspension cultures of cells were initiated by addition of cut pieces of the resulting calli to the MS or Gamborg liquid medium (pH 5.8) containing 0.2 mg/ml 2,4-D. The cell suspension cultures (30 ml each in 100 ml conical flasks) were kept on gyratory shakers (120 rpm) at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ under continuous light, and sub-cultured using 30 ml of 7-day cultures as inocula. Cells were harvested for the O_3 experiments 4-days after sub-culturing.

Ozone exposure

Ozone exposure of the cell suspension was performed as previously described [10]. Ozonized air (0.1 L/min; 10 mg O_3/h) was passed on the surface of the cell suspensions (250 μL in 4 mL tubes). By this way the cells could be exposed to the pulse of O_3 for 3 or 10 min. Ozone was generated by a ceramic ozonizer (NAVI Super Ceramics Ozonizer EO-mini, Kenis Kagaku Kyoisha Ltd., Tokyo, Japan), equipped with an air pump.

Cell viability assays

Cell viability was assayed using the vital dye, Evans blue, after air or ozone treatment with or without the appropriate pharmacological effectors (pretreatment of 15 min prior O_3 exposure). Cells (50 μL) were incubated for 5 min in 1 ml phosphate buffer pH 7 supplemented with Evans blue to a final concentration of 0.005%. Cells that accumulated Evans blue were considered dead. At least 1000 cells were counted for each independent treatment and repeated at least 4 times for each condition.

Cell viability was also checked using fluorescein diacetate (FDA) as previously described [43]. Briefly, after the appropriate treatment, 1 mL of cell suspension was gently stirred with a magnetic stirrer before FDA was added to a final concentration of 12 μM . The fluorescence increase was monitored over a 120 s period using a F-2000 spectrofluorimeter (Hitachi, Japan). Results are presented as the percentage of cell death = (slope of treated cells/slope of non treated cells) * $100 \pm \text{SE}$. The experiment was repeated at least 4 times for each condition.

DNA extraction and analysis

Frozen cells were ground in liquid nitrogen and genomic DNA was extracted according to the CTAB method [80]. DNA electrophoresis was performed to assess DNA fragmentation. DNA samples (5 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were loaded onto a 1.8% agarose gel including 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide.

Electrophysiology

Individual cells were impaled and voltage-clamped in the culture medium using an Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) for discontinuous single electrode voltage clamp experiments as previously described [26,37,43]. Voltage and current were digitized using a computer fitted with a Digidata 1320A acquisition board (Axon Instruments). The electrometer was driven by pClamp software (pCLAMP8, Axon Instruments). Experiments were conducted on 4-day-old cultures at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (main ions in the medium after 4 d of culture: 9 mM K^+ , 11 mM NO_3^- , [41]).

Aequorin luminescence measurements

Cytoplasmic Ca^{2+} variations were recorded using freshly generated *A. thaliana* cell suspensions (T87) expressing apoaquorin [81]. For calcium measurements, aequorin was reconstituted by

the overnight incubation of the cell suspension in Gamborg medium containing 2.5 μM native coelenterazine. Cell culture aliquots (500 μL) were transferred carefully to a luminometer glass tube, and the luminescence counts were recorded continuously at 0.2 s intervals with a FB12-Berthold luminometer. Treatments with air or ozone were performed directly in the luminometer. At the end of each experiment, the residual aequorin was discharged by addition of 500 μL of a 1 M CaCl_2 solution dissolved in 100% methanol. The resulting luminescence was used to estimate the total amount of aequorin for each condition. Calibration of calcium levels was performed using the equation: $\text{pCa} = 0.332588(-\log k) + 5.5593$, where k is a rate constant equal to luminescence counts per second divided by total remaining counts. Data are expressed as μM and are means \pm SE.

Monitoring of ROS Production

The production of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and $\text{O}_2^{\cdot-}$ was monitored by the chemiluminescence of the *Cypridina* luciferin analog (CLA) as previously described [13]. CLA-chemiluminescence specifically indicates the presence of $\text{O}_2^{\cdot-}$, and of $^1\text{O}_2$ to a lesser extent, but not other ROS [82]. Chemiluminescence from CLA was monitored using a FB12-Berthold luminometer (with a signal integrating time of 0.2 s). For the statistical analysis of the data, the luminescence ratio (L/L_{basal}) was calculated by dividing the luminescence intensities of CLA-luminescence (L) with the luminescence intensity before air or ozone treatment (L_{basal}).

RT-PCR analysis of gene expression

Four-day-old cells were treated with O_3 , harvested and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was prepared using the GeneluteTM Mammalian Total RNA Kit (Sigma). RNA was treated by the Deoxyribonuclease I Kit (Sigma). Total RNA was quantified by spectrophotometry and their integrity checked on denaturing agarose gels. Total RNA (2 μg) was converted into first-strand cDNA with the SuperscriptTM II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and oligo(dT) primers. One μL of cDNA was amplified in a 25 μL PCR mixture. *VPE α* , *VPE β* , and *VPE γ* primers were designed (*VPE α* forw: GCGAAGAAC-GAGGAGAATCCAA, *VPE α* rev: TGCTCGTGCAAAGTCT-CTGTTT; *VPE β* forw: ACAATGACCACCGTCGTTTCCT, *VPE β* rev: TAGGGCGGAGACGAAGATCAAG; *VPE γ* forw: GACCATGGTGGTCCCTGGAGTTC, *VPE γ* rev: ATTCCG-CATCCGCAAAGGTAATAA). Control PCR was performed using the housekeeping gene *EF1 α* [83]. Thermal cycling conditions were as follows: an initial denaturation step at 94°C 2 min, followed by 34 cycles (or by 26 cycles for *EF1 α*), of 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min 30 s, and ending with a single step at 72°C 10 min. PCR products were separated by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide fluorescence. Representative results from three independent experiments are shown.

Supporting Information

Figure S1 Effect of O_3 on mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) of *A. thaliana* cells. Mean values of JC-1 fluorescence ratio (high ψm versus low ψm) measured 15 minutes after exposing the cells to ozonized air for 10 min and effect of 5 mM dabco and 200 μM glibenclamide (gli) on the decrease of JC1 fluorescence ratio induced by O_3 . Valinomycin at 1 μM was used as a positive control. Data are representative of at least 4 independent experiments and error bars correspond to standard errors.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013373.s001 (0.10 MB TIF)

Acknowledgments

The authors thank JB Thibaud (UMR 5004 CNRS-INRA-SupAgro-UM2, Montpellier, France) and M Hodges (Institut de Biologie des Plantes, Bât. 630, Université Paris-Sud 11, Orsay, France) for carefully reading the manuscript. Thanks are also due to M Brault for kind gift of aequorin transformed *A. thaliana* cells.

References

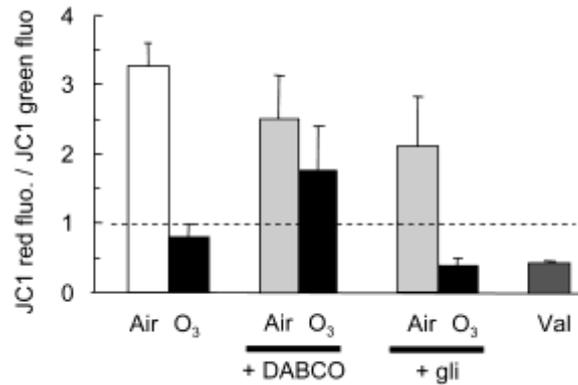
- Pell EJ, Schlagnhauer CD, Arteca RN (1997) Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100: 264–273.
- Kangasjarvi J, Talvinen J, Utraiainen M, Karjalainen R (1994) Plant Defense Systems Induced by Ozone. *Plant Cell and Environment* 17: 783–794.
- Kangasjarvi J, Jaspers P, Kollist H (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell and Environment* 28: 1021–1036.
- Overmyer K, Brosche M, Pellinen R, Kuitinen T, Tuominen H, et al. (2005) Ozone-induced programmed cell death in the Arabidopsis radical-induced cell death1 mutant. *Plant Physiology* 137: 1092–1104.
- Pasqualini S, Piccioni C, Reale L, Ederli L, Della Torre G, et al. (2003) Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* 133: 1122–1134.
- Sandermann H (2008) Ecotoxicology of ozone: Bioactivation of extracellular ascorbate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366: 271–274.
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251–275.
- Clayton H, Knight MR, Knight H, McAinsh MR, Hetherington AM (1999) Dissection of the ozone-induced calcium signature. *Plant Journal* 17: 575–579.
- Evans NH, McAinsh MR, Hetherington AM, Knight MR (2005) ROS perception in Arabidopsis thaliana: the ozone-induced calcium response. *Plant Journal* 41: 615–626.
- Kadono T, Yamaguchi Y, Furuichi T, Hirono M, Garrec JP, et al. (2006) Ozone-induced cell death mediated with oxidative and calcium signaling pathways in tobacco bel-w3 and bel-B cell suspension cultures. *Plant Signal Behav* 1: 312–322.
- Baier M, Kandlbinder A, Gollack D, Dietz KJ (2005) Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant Cell and Environment* 28: 1012–1020.
- Sharma YK, Davis KR (1997) The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 480–488.
- Sandermann H, Ernst D, Heller W, Langebartels C (1998) Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science* 3: 47–50.
- Rao MV, Davis KR (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta* 213: 682–690.
- Tamaoki M, Matsuyama T, Kanna M, Nakajima N, Kubo A, et al. (2003) Differential ozone sensitivity among Arabidopsis accessions and its relevance to ethylene synthesis. *Planta* 216: 552–560.
- Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, et al. (2000) Ozone-sensitive Arabidopsis rcd1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12: 1849–1862.
- Vahala J, Ruonala R, Keinanen M, Tuominen H, Kangasjarvi J (2003) Ethylene insensitivity modulates ozone-induced cell death in birch. *Plant Physiology* 132: 185–195.
- Moeder W, Barry CS, Tauriainen AA, Betz C, Tuomainen J, et al. (2002) Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiol* 130: 1918–1926.
- Ahlfors R, Brosche M, Kollist H, Kangasjarvi J (2009) Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* 58: 1–12.
- Dauphin A, El-Maarouf H, Vienney N, Rona JP, Bouteau F (2001) Effect of desiccation on potassium and anion currents from young root hairs: Implication on tip growth. *Physiologia Plantarum* 113: 79–84.
- de Angeli A, Thomine S, Frachisse JM, Ephritikhine G, Gambale F, et al. (2007) Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Lett* 581: 2367–2374.
- Roberts SK (2006) Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist* 169: 647–666.
- Colombet J, Mathieu Y, Peyronnet R, Agier N, Lelievre F, et al. (2009) R-type anion channel activation is an essential step for ROS-dependent innate immune response in Arabidopsis suspension cells. *Functional Plant Biology* 36: 832–843.
- Brault M, Amiar Z, Pennarun AM, Monestiez M, Zhang Z, et al. (2004) Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in Arabidopsis suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca²⁺ dependent. *Plant Physiol* 135: 231–243.
- Trouverie J, Vidal G, Zhang Z, Sirichandra C, Madiona K, et al. (2008) Anion Channel Activation and Proton Pumping Inhibition Involved in the Plasma Membrane Depolarization Induced by ABA in Arabidopsis thaliana Suspension Cells are Both ROS Dependent. *Plant and Cell Physiology* 49: 1495–1507.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TK DT RE TH PM JB TK FB. Performed the experiments: TK DT RE TH JB. Analyzed the data: TK DT TH TK FB. Contributed reagents/materials/analysis tools: RE MH. Wrote the paper: TK DT PM TK FB.

- Meimoun P, Vidal G, Bohrer AS, Lehner A, Tran D, et al. (2009) Intracellular Ca²⁺ stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav* 4: 830–835.
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, et al. (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483–U413.
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, et al. (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 21425–21430.
- Lee SC, Lan WZ, Buchanan BB, Luan S (2009) A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 21419–21424.
- Vahisalu T, Puzorjova I, Brosche M, Valk E, Lepiku M, et al. (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J*.
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, et al. (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452: 487–491.
- Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse JM, Barbier-Brygoo H, Pugin A (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* 14: 1937–1951.
- Gauthier A, Lamotte O, Rebutier D, Bouteau F, Pugin A, et al. (2007) Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal Behav* 2: 86–95.
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, et al. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305: 855–858.
- Lam E (2005) Vacuolar proteases living up programmed cell death. *Trends in Cell Biology* 15: 124–127.
- Rebutier D, Bouteau F (2008) Harpins and ion channels modulations: Many ways to die. *Plant Signal Behav* 3: 314–316.
- Errakhi R, Meimoun P, Lehner A, Vidal G, Briand J, et al. (2008) Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *J Exp Bot* 59: 3121–3129.
- Yu SP, Choi DW (2000) Ions, cell volume, and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 9360–9362.
- Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X, et al. (2006) Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol* 209: 21–29.
- Rao MV, Koch JR, Davis KR (2000) Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biology* 44: 345–358.
- Rebutier D, Bianchi M, Brault M, Roux C, Dauphin A, et al. (2002) The indolic compound hypaphorine produced by ectomycorrhizal fungus interferes with auxin action and evokes early responses in nonhost Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 932–938.
- Rebutier D, Frankart C, Vedel R, Brault M, Duggleby RG, et al. (2005) A CFTR chloride channel activator prevents HrpN(ea)-induced cell death in Arabidopsis thaliana suspension cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 567–572.
- Rebutier D, Frankart C, Briand J, Bilgüç B, Rona JP, et al. (2007) Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpN(ea)-induced cell death in Arabidopsis thaliana. *J Cell Sci* 120: 3271–3278.
- Errakhi R, Dauphin A, Meimoun P, Lehner A, Rebutier D, et al. (2008) An early Ca²⁺ influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in Arabidopsis thaliana cells. *J Exp Bot* 59: 4259–4270.
- Schroeder JI, Keller BU (1992) 2 Types of Anion Channel Currents in Guard-Cells with Distinct Voltage Regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 5025–5029.
- Hedrich R, Busch H, Raschke K (1990) Ca²⁺ and Nucleotide Dependent Regulation of Voltage Dependent Anion Channels in the Plasma-Membrane of Guard-Cells. *Embo Journal* 9: 3889–3892.
- Yokawa K, Suzuki N, Kawano T (2004) Ethanol enhanced singlet oxygen dependent chemiluminescence interferes with the monitoring of biochemical superoxide generation with a chemiluminescence probe, Cypridina luciferin analog. *ITE Letters on Batteries, New Technologies and Medicine* 5: 49–52.
- Wrzaczek M, Brosche M, Kollist H, Kangasjarvi J (2009) Arabidopsis GRI is involved in the regulation of cell death induced by extracellular ROS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 5412–5417.

49. Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, et al. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731–734.
50. Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M, Nishimura M (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 404–408.
51. Kinoshita T, Nishimura M, Hara-Nishimura I (1995) The sequence and expression of the gamma-VPE gene, one member of a family of three genes for vacuolar processing enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 36: 1555–1562.
52. Tamaoki M (2008) The role of phytohormone signaling in ozone-induced cell death in plants. *Plant Signal Behav* 3: 166–174.
53. Yu YB, Adams DO, Yang SF (1979) 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 198: 280–286.
54. Satoh S, Esashi Y (1980) Alpha-aminobutyric acid: a probable competitive inhibitor of conversion of 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid to ethylene. *Plant and Cell Physiology* 21: 939–949.
55. Moore R, Smith JD (1984) Growth, Gravidness and Abscisic-Acid Content of Zea-Mays Seedlings Treated with Fluridone. *Planta* 162: 342–344.
56. Lamotte O, Courtois C, Dobrowolska G, Besson A, Pugin A, et al. (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana glauca* cells. *Free Radical Biology and Medicine* 40: 1369–1376.
57. Hennig J, Malamy J, Gryniewicz G, Indulski J, Klessig DF (1993) Interconversion of the Salicylic-Acid Signal and Its Glucoside in Tobacco. *Plant Journal* 4: 593–600.
58. Kawano T, Tanaka S, Kadono T, Muto S (2004) Salicylic acid glucoside acts as a slow inducer of oxidative burst in tobacco suspension culture. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 59: 684–692.
59. Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X, et al. (2006) Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *Journal of Membrane Biology* 209: 21–29.
60. Ward JM, Pei ZM, Schroeder JI (1995) Roles of Ion Channels in Initiation of Signal-Transduction in Higher-Plants. *Plant Cell* 7: 833–844.
61. Cho MH, Spalding EP (1996) An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8134–8138.
62. Roelfsema MR, Levchenko V, Hedrich R (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J* 37: 578–588.
63. Lam E (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 305–315.
64. Bortner CD, Cidlowski JA (2007) Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: Role in apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462: 176–188.
65. Torsethaugen G, Pell EJ, Assmann SM (1999) Ozone inhibits guard cell K⁺ channels implicated in stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13577–13582.
66. Liu RS, Garvin JL, Ren YL, Pagano PJ, Carretero OA (2007) Depolarization of the macula densa induces superoxide production via NAD(P)H oxidase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 292: F1867–F1872.
67. Patel S, Vemula J, Konikkat S, Barthwal MK, Dikshit M (2009) Ion channel modulators mediated alterations in NO-induced free radical generation and neutrophil membrane potential. *Free Radical Research* 43: 514–521.
68. Cessna SG, Low PS (2001) Activation of the oxidative burst in *aequorin*-transformed *Nicotiana tabacum* cells is mediated by protein kinase- and anion channel-dependent release of Ca²⁺ from internal stores. *Planta* 214: 126–134.
69. Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, et al. (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 711–724.
70. Kawano T, Sahashi N, Takahashi K, Uozumi N, Muto S (1998) Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: The earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant and Cell Physiology* 39: 721–730.
71. Kawano T, Muto S (2000) Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *Journal of Experimental Botany* 51: 685–693.
72. Umemura K, Satou J, Iwata M, Uozumi N, Koga J, et al. (2009) Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, OsSGT1, to chemically induced disease resistance in rice plants. *Plant Journal* 57: 463–472.
73. Hatsugai N, Kuroyanagi M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2006) A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis* 11: 905–911.
74. Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, et al. (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J* 19: 43–53.
75. Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H, Kangasjarvi J (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *Plant J* 39: 59–69.
76. Axelos M, Curie C, Mazzolini L, Bardet C, Lescure B (1992) A Protocol for Transient Gene-Expression in *Arabidopsis*-*Thaliana* Protoplasts Isolated from Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 30: 123–128.
77. Sano T, Higaki T, Handa K, Kadota Y, Kuchitsu K, et al. (2006) Calcium ions are involved in the delay of plant cell cycle progression by abiotic stresses. *Febs Letters* 580: 597–602.
78. Terta M, Kettani-Halabi M, Ibenyassine K, Tran D, Meimoun P, et al. (2010) *Arabidopsis thaliana* Cells: A Model to Evaluate the Virulence of *Pectobacterium carotovorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 139–143.
79. van Doorn WG, Woltering EJ (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* 10: 117–122.
80. Haymes KM, Ibrahim IA, Mischke S, Scott DL, Saunders JA (2004) Rapid isolation of DNA from chocolate and date palm tree crops. *J Agric Food Chem* 52: 5456–5462.
81. Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Tretheway AJ (1991) Transgenic Plant *Aequorin* Reports the Effects of Touch and Cold-Shock and Elicitors on Cytosolic Calcium. *Nature* 352: 524–526.
82. Nakano M, Sugioka K, Ushijima Y, Goto T (1986) Chemiluminescence Probe with Cypridina Luciferin Analog, 2-Methyl-6-Phenyl-3,7-Dihydroimidazo[1,2-a]Pyrazin-3-One, for Estimating the Ability of Human-Granulocytes to Generate O₂⁻. *Analytical Biochemistry* 159: 363–369.
83. Bouizgarne B, El-Maarouf-Bouteau H, Madiona K, Biligui B, Monestiez M, et al. (2006) A putative role for fusaric acid in biocontrol of the parasitic angiosperm *Orobancha ramosa*. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 550–556.



Supplemental figure : Effect of O₃ on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of *A. thaliana* cells.

Mean values of JC-1 fluorescence ratio (high $\Delta\Psi_m$ versus low $\Delta\Psi_m$) measured 15 minutes after exposing the cells to ozonized air for 10 min and effect of 5 mM DABCO and 200 μ M glibenclamide (gli) on the decrease of JC1 fluorescence ratio induced by O₃. Valinomycin at 1 μ M was used as a positive control. Data are representative of at least 4 independent experiments and error bars correspond to standard errors.

2.3 A role for oxalic acid generation in ozone-induced signalization.

Article 2: Daniel Tran, Maria Lia Molas, Takashi Kadono, Rafik Errakhi, Joël Briand, Bernadette Biligui, Tomonori Kawano, François Bouteau ;

“A role for oxalic acid generation in ozone-induced signalization.”

Article en préparation pour publication

**A role for oxalic acid generation in ozone-induced signalization
in *Arabidopsis* cells.**

Daniel Tran^{1,§}, Maria Lia Molas², Takashi Kadono^{1,3}, Rafik Errakhi¹, Joël Briand¹, Bernadette Biligui¹,
Tomonori Kawano^{1,3}, François Bouteau^{1,3}

¹ Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, LEM, Institut de Biologie des Plantes, Bât 630, 91405 Orsay, France

² Facultad de Agronomía, Ruta 35 km 334. L 6300. Santa Rosa, La Pampa, Argentina

³ Graduate School of Environmental Engineering, University of Kitakyushu 1-1, Hibikino, Wakamatsuku, Kitakyushu 808-0135, Japan

[§] Corresponding author: Daniel Tran

tel: 33 (0)169153315

fax: 33 (0)169153424

E-mail: daniel.tran@univ-paris-diderot.fr

Running title: Ozone-induced oxalate signalization

Abstract

Ozone is an air pollutant which impact is increasingly important in our industrialized world. It affects human health and productivity in various crops. We provide the evidences that treatment of *Arabidopsis thaliana* with ozone results in ascorbate-derived oxalic acid production. Using cultured cells of *A. thaliana* as a model; here, we further showed that oxalic acid induces activation of anion channels that triggers depolarization of the cell, increase in cytosolic Ca²⁺ concentration, generation of reactive oxygen species and cell death. We confirmed that ozone reacts with ascorbate in the culture thus resulting in production of oxalic acid and this could be part of the ozone-induced signaling pathways that triggers programmed cell death.

Keywords index: anion channel, *Arabidopsis thaliana*, ascorbate, oxalic acid, ozone

List of abbreviations

AsA, ascorbic acid; DHA, dehydroascorbate; FW, fresh weight; O₃, ozone ; OA, oxalic acid ; PCD, programmed cell death ; ROS, reactive oxygen species; [Ca²⁺]_{cyt}, cytosolic calcium; PM, plasma membrane.

Introduction

Ozone (O_3) is a gaseous air pollutant that causes damages to animals and plants. In animals, exposure to O_3 affects mainly respiratory systems, especially functions of lungs (Enami, Hoffmann & Colussi, 2008). In plants, exposure to O_3 often induces a disturbance in photosynthesis and metabolism, and therefore finally resulting in the loss of crop yields and forest declines (Pell, Schlagnhauser & Arteca, 1997). An acute exposure to O_3 causes lesions formation on the leaves of sensitive plants due to localized progress in programmed cell death (PCD) (Kangasjarvi, Talvinen, Utriainen & Karjalainen, 1994, Sandermann, Ernst, Heller & Langebartels, 1998). Following the uptake of O_3 from stomata, the first biochemical barriers against O_3 within plant tissues would be the events in apoplast. As O_3 readily breaks down into various reactive oxygen species (ROS) (Sandermann, 2008), the pool of ascorbic acid (AsA) within the apoplast, as in fluid films covering the pulmonary epithelium acts as a part of the initial line of defense against oxidative stresses (Enami et al., 2008, Foyer & Noctor, 2011). Such plant protective roles of AsA in relation to the resistance to O_3 have been well documented (Eller & Sparks, 2006, Luwe, 1996, Polle, Wieser & Havranek, 1995). When AsA in the apoplast reacts with oxidants, it is oxidized yielding short lived dehydroascorbate (DHA). For supporting the AsA-mediated protection against oxidative stress, AsA must be recycled from its oxidized forms (DHA) through reducing events inside the plant cells after transportation across the plasma membrane (PM), thus AsA can be continuously supplied to the apoplast to react with oxidants (Foyer & Noctor, 2011). Ascorbic acid is thus highly abundant in plants, often attaining millimolar concentrations in most of cell compartments (Foyer & Noctor, 2011, Smirnoff & Wheeler, 2000) and plant cells also respond to oxidative stress by rapidly exporting AsA into the apoplast (Parsons & Fry, 2010). Accordingly, O_3 sensitivity generally correlates with the whole AsA status (Sandermann, 2008) and several *A. thaliana* mutants with reduced AsA content (vtc mutants) were isolated and characterized as O_3 sensitive mutants (Conklin, Saracco, Norris & Last, 2000). In most plants, AsA degradation can occur via dehydroascorbate (DHA), yielding oxalic acid (OA) (Green & Fry, 2005, Yang & Loewus, 1975). The reaction of O_3 with AsA was thus suggested to lead to production of OA (Sandermann, 2008), which is a potent inducer of PCD in plants (Errakhi, Meimoun, Lehner, Vidal, Briand, Corbineau, Rona & Bouteau, 2008, Kim, Min & Dickman, 2008). We recently showed that O_3 induces the activation of a PM anion channel which was an early prerequisite of O_3 -induced PCD in cultured cells of *A. thaliana* (Kadono, Tran, Errakhi, Hiramatsu, Meimoun, Briand, Iwaya-Inoue, Kawano & Bouteau, 2010), similarly to the observed effect of OA treatment leading to PCD (Errakhi et al., 2008). We therefore search for a putative role for OA generation in O_3 -induced cell death by using cultured cells of *A. thaliana* with a working hypothesis connecting the actions of O_3 , OA and signaling components.

In our model, the oxidative cell death observed in response to O_3 was mediated by the interplay between anion channel activation, Ca^{2+} influx, and ROS generation (Kadono et al., 2010). In the present study, we analyzed the impact of OA on these different key factors of the signaling pathways leading to O_3 -induced PCD. OA is effectively produced in cultured cells in response to O_3 , and only in the AsA-rich seedlings. Furthermore, the level of OA correlates with activation of anion

channel, increase in cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$), generation of ROS and cell death, highlighting a possible role for OA, as a secondary toxicant, in the O_3 -induced PCD.

Material and methods

Cell culture conditions

Suspension-cultured cells of *A. thaliana* (ecotype Col-0) were grown in Gamborg medium (pH 5.8) (Kadono et al., 2010). They were maintained at 22 ± 2 °C, under continuous white light ($40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and continuous shaking at 120 rpm. All experiments were performed at 22 ± 2 °C using the cells in log-phase (4 days after sub-culturing).

Plant culture conditions

A. thaliana seeds (ecotype Columbia and *vtc 1-1* mutant obtained from NASC mutant collections) were sown in vitro on solid Gamborg medium and grown in a growth chamber under a light cycle of 12 h light and 12 h dark with $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at 22°C.

Ozone exposure

Ozone exposure of the cultured cells was performed with ozonized air passed on the surface of the cell suspensions (10 mL; packed cell volume, 75%). For assays using seedlings, 15 d-old seedlings were exposed to O_3 in an enclosed chamber. By this way the cells or seedlings were exposed to the pulses of O_3 for 10 min (flow, 0.1 L.min⁻¹; 10 mg O_3 .h⁻¹).

Oxalate assay

For oxalate determination, soluble OA was isolated from 500 mg fresh weight (FW) of tissues and cells prepared from 15 d-old seedling tissues and 4 d-old cultured cells, respectively, were ground in a mortar and pestle in 2 mL of distilled water (Guo, Tan, Zhu, Lu & Zhou, 2005). The homogenates were boiled for 15 min, and kept statically overnight, and centrifuged at $15,000 \times g$ for 15 min. Phosphoric-tungstate reagent (500 μl) were added in 1 mL of supernatant, and kept statically for 5 h, prior to centrifugation for 10 min at $15,000 \times g$. Obtained solution was adjusted to pH 4.5 with ammonium hydroxide dropwise, supplemented with 500 μl of calcium chloride reagent (0.45 M CaCl_2 in 1 M acetic acid, pH 4.5) and kept at 4°C for over 16 h. Again the mixture was centrifuged for 10 min as above, and the supernatant liquid was removed. The precipitate was dissolve in 500 μL of 10% sulfuric acid, and incubated in water-bath at 100°C for 2 min and titration of OA with 2.5 mM potassium permanganate (KMnO_4) was performed. Data are expressed as $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW with means \pm SE.

Ascorbic Acid assays

Cells were harvested and weighed, then ground with a mortar and pestle in 4 ml of 5% trichloroacetic acid at 4°C. The homogenates were centrifuged at $13,000 \times g$ for 15 min. Total AsA was determined according to the method of Rutkowski, Grzegorzczuk, & Greger (2004). Briefly, to a 500 μl sample of the supernatant, 500 μl of phosphoric-tungstate reagent was added and kept at ambient temperature for 30 min. Then the absorbance of samples (Ax) at 700 nm was

spectroscopically recorded. For DHA assay, prior to addition of phosphoric tungstate, 10 µL of dithiothreitol (10 mM) was added and incubated at ambient temperature for 10 min to reduce DHA. Then 100 µL of N-ethylmaleimide (0.5%) was added for masking the excess of dithiothreitol. AsA concentration in the sample solution (C_x , µM) was determined by comparing A_x with absorbance of the standard sample (A_s) with 56.8 µM of AsA, according the formula $C_x = A_x/A_s \cdot C_s$ where C_s corresponds to the concentration of the standard solution.

DHA concentrations were determined by subtracting the reduced AsA to the total AsA. Data are expressed as nmol.g^{-1} FW with means \pm SE.

Phosphotungstate reagent

To prepare periodically the reagent, 15 g of Na_2WO_4 (Sigma) and 6 g of Na_2HPO_4 (Sigma) were mix with heating in 24 ml deionized water. Then 14.5 ml of H_2SO_4 (3.7 M) were added slowly. The solution was heated for 2 hours with reflux condenser not allowing it to boiling. After cooling the solution down, pH was adjusted to 1.0 with H_2SO_4 dropwise.

Electrophysiology

Individual cells were impaled and voltage-clamped in the culture medium using an Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) for discontinuous single electrode voltage clamp experiments as previously described (Errakhi et al., 2008, Meimoun, Vidal, Rebutier, Frankart, Briand, Biligui, Rona, Haapalainen, Barny & Bouteau, 2007, Bohrer, Lehner, Tran, Briand, Bouteau & Rona, 2009, Kadono et al., 2010). Voltage and current were digitized using a computer fitted with a Digidata 1320A acquisition board (Axon Instruments). The electrometer was driven by pClamp software (pCLAMP8, Axon Instruments). Experiments were conducted on 4-day-old cultures at 22°C (main ions in the medium after 4 d of culture: 9 mM K^+ , 11 mM NO_3^- , (Rebutier, Bianchi, Brault, Roux, Dauphin, Rona, Legue, Lapeyrie & Bouteau, 2002).

Aequorin luminescence measurements

Variations in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ were recorded using freshly generated *A. thaliana* cell suspensions expressing apoaequorin (Kadono et al., 2010). For $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ measurements, aequorin was reconstituted by the overnight incubation of the cell suspension in Gamborg medium containing 2.5 µM native coelenterazine. Cell culture aliquots (500 µL) were transferred carefully to a luminometer glass tube, and the luminescence counts were recorded continuously at 0.2 s intervals with a FB12-Berthold luminometer. Treatments with air or ozone were performed directly in the luminometer. At the end of each experiment, the residual aequorin was discharged by addition of 500 µL of a 1 M CaCl_2 solution dissolved in 100% methanol. The resulting luminescence was used to estimate the total amount of aequorin for each condition. Calibration of calcium levels was performed using the equation: $\text{pCa} = 0.332588(-\log k) + 5.5593$, where k is a rate constant equal to luminescence counts per second divided by total remaining counts. Data are expressed as µM with means \pm SE.

Monitoring of ROS production

The production of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$) was monitored by the chemiluminescence of the *Cypridina* luciferin analog (CLA) as previously described (Kadono et al., 2010). CLA-chemiluminescence specifically indicates the presence of $\text{O}_2^{\bullet-}$, and of $^1\text{O}_2$ to a lesser extent, but not other ROS (Nakano, Sugioka, Ushijima & Goto, 1986). Chemiluminescence from CLA was monitored using a FB12-Berthold luminometer (with a signal integrating time of 0.2 s). For the statistical analysis of the data, the luminescence ratio ($L_{\text{induced}}/L_{\text{basal}}$) was calculated by dividing the induced luminescence intensities of CLA-luminescence (L_{induced}) with the luminescence intensity before stimulation (L_{basal}).

Cell viability assays

Cell viability was checked using fluorescein diacetate (FDA) as previously described (Reboutier et al., 2007). Briefly, after the appropriate treatment, 1 mL of cell suspension was gently stirred with a magnetic stirrer before FDA was added to a final concentration of 12 mM. The fluorescence increase was monitored over a 120 s period using a F-2000 spectrofluorimeter (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan). Results are presented as the percentage of cell death = (slope of treated cells/slope of non treated cells) • 100 ± SE. Cell viability was also checked using the vital dye, Evans blue (Kadono et al., 2010). Cells (50 µl) were incubated for 5 min in 1 ml phosphate buffer pH 7 supplemented with Evans blue to a final concentration of 0.005%. Cells that accumulated Evans blue were considered dead. At least 1000 cells were counted for each independent treatment. The experiment was repeated at least 4 times for each condition.

Results

Oxalic acid is generated from AsA upon O₃ treatment

While L-ascorbic acid could be converted to OA in plants and in suspension cells (Green & Fry, 2005, Yang & Loewus, 1975), and O₃ sensitivity correlates with the AsA status of the plants (Sandermann, 2008); to our knowledge, generation of OA in response to O₃ has not been demonstrated to date. Based on this hypothesis, *A. thaliana* suspension cells were used for the measurements of both AsA and OA contents after being exposed to O₃ for 10 min. Decrease in total AsA content in the cells occurs during the 10 min of O₃ treatment (Fig. 1a). Although the observed trend was similar to the results with cells, significant decrease in AsA content in the extracellular medium was not observed (Fig. 1b). It was also the same for the behaviors of DHA content in the cells and the extracellular medium before and after the O₃ treatment (Fig. 1a, b). Nevertheless, in the AsA pool, ca 60% of AsA molecules was at oxidized DHA state (thus ca. 40 % in the reduced state) in the air treated cells whereas the AsA pool in the O₃-treated cells almost fully consists of DHA (Fig. 1a). We observed that the increase in OA content coincides with the decrease in cellular pool of reduced AsA in the O₃-treated cells (Fig. 1a). Such O₃-induced accumulation of OA was also observed in the extracellular medium (Fig. 1b) even if significant decrease in AsA was not observed. The OA content in the medium attained 188 ± 16 µM after O₃ exposure. It is most likely that AsA, DHA and OA levels are all

maintained at relatively low level as a consequence of their dilution from apoplast since the liquid phase of the cell wall is in almost free contact with the medium and thus the induced change accompanying the oxidative stress could be buffered.

We further checked *in planta* if OA content could be increase upon O₃ treatment or not. Using 15-d old *Arabidopsis* seedlings, a large increase in OA level was observed (Fig. 2). To assess our working hypothesis on the role of AsA in OA generation, we used the *A. thaliana vtc 1-1* mutant, which has merely 10-30% of AsA content, compared to wild-type plants (Conklin et al., 2000). Upon O₃ treatment of *vtc 1-1* seedlings, no significant increase in OA level was observed (Fig. 2). Taken together, above results clearly suggest that rapid generation of OA in response to O₃ treatment is due to degradation of AsA in *A. thaliana*. We thus further checked for the impact of OA in the course of cellular responses to O₃, especially the early events in the O₃-responsive signal transduction model previously proposed by our group (Kadono et al., 2010).

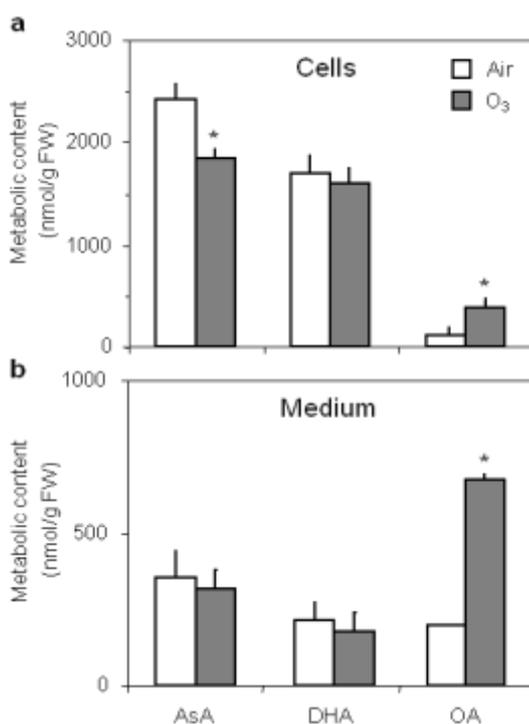


Figure 1. Oxalic acid is produced from AsA in response to O₃ in *A. thaliana* cells.

Ascorbate, DHA and OA contents in cells (a) and in the medium (b) after exposure for 10 min of air with or without O₃. Data correspond to mean values \pm SE of at least 3 independent experiments. * Significantly different, $P < 0.05$.

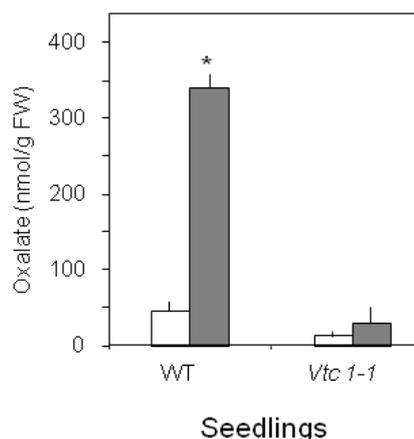


Figure 2. Oxalic acid is produced from AsA in response to O₃ in *A. thaliana* seedlings.

Oxalic acid contents in 15-d old seedlings of *A. thaliana* (Col-0), wild-type and *vtc 1-1* mutant, after exposure for 10 min of air with or without O₃. Data correspond to mean values \pm SE of at least three independent experiments. * Significantly different, $P < 0.05$.

Oxalic acid induces activation of anion channels

In cultured cells of *A. thaliana*, sub-millimolar concentrations of OA reportedly induce PCD by involving the activation of anion channel (Errakhi et al., 2008), as observed upon O₃ treatment (Kadono et al., 2010). Here, we therefore, investigated if micromolar concentrations of OA, in the range inducible in O₃-treated cells and tissue as we observed above, are capable of cell polarization and ion currents.

We recorded a rapid depolarization of about $+15 \pm 6$ mV ($n=16$) in the cells treated with 100 μ M OA (Fig. 3a), from a mean membrane potential of -44 ± 4 mV ($n=16$) recorded prior to the treatment. In fact, the observed depolarization was correlated with an increase in ion current of -1.48 ± 0.2 nA (after 6 s for a pulse of -200 mV, $n=16$), from a mean control value of -0.59 ± 0.3 nA ($n=16$) (Fig. 3b). Although this current presents the features of slow anion channels (Schroeder & Keller, 1992), some extent of the instantaneous current could be carried out by fast activating anion channels as described for guard cells (Hedrich, Busch & Raschke, 1990). In these conditions, addition of 10 mM choline chloride induced a negative shift of the reversal potential of this current of -15 ± 3 mV ($n=5$, not shown) as expected for an anion current, considering an increase of the main permeant anions (NO₃⁻, Cl⁻) in the 4d old cell culture from 11 mM (Reboutier et al., 2002) to 21 mM, with an internal concentration estimated at 5 mM. In our model, this type of current was shown to be highly sensitive to a series of structurally unrelated anion channel inhibitors (Kadono et al., 2010, Reboutier et al., 2002). Accordingly, the increase in ion current after OA addition was effectively reversed after addition of 200 μ M of glibenclamide, an anion channel blocker, confirming the anionic nature of these currents (Fig. 3b). These data suggest that OA, as a secondary toxicant, could participate in the early O₃-responsive signaling events by increasing anion currents and subsequent cell depolarization.

Oxalic acid triggered cytosolic calcium increase

The changes in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in response to O₃ have also been reported for the cells of *A. thaliana* (Kadono et al., 2010) and tobacco (Kadono, Yamaguchi, Furuichi, Hirono, Garrec & Kawano, 2006).

We thus monitored the $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ variations in the transgenic cells of *A. thaliana* expressing apoaequorin exclusively addressed in the cytosol. A rapid and transient increase in $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ was induced in response to OA in a dose-dependent manner (Fig. 4). The $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ variation was even inducible by micromolar concentrations of OA (50, 100 and 200 μM), and the maximal increase was attained within 3-4 min after addition of OA (Fig. 4). After peaking of $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase, the level of $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ returned to the basal level after 20 minutes (not shown). Taken together, OA production via ozonolysis of AsA could be one of efficient path for stimulating the increase in $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$.

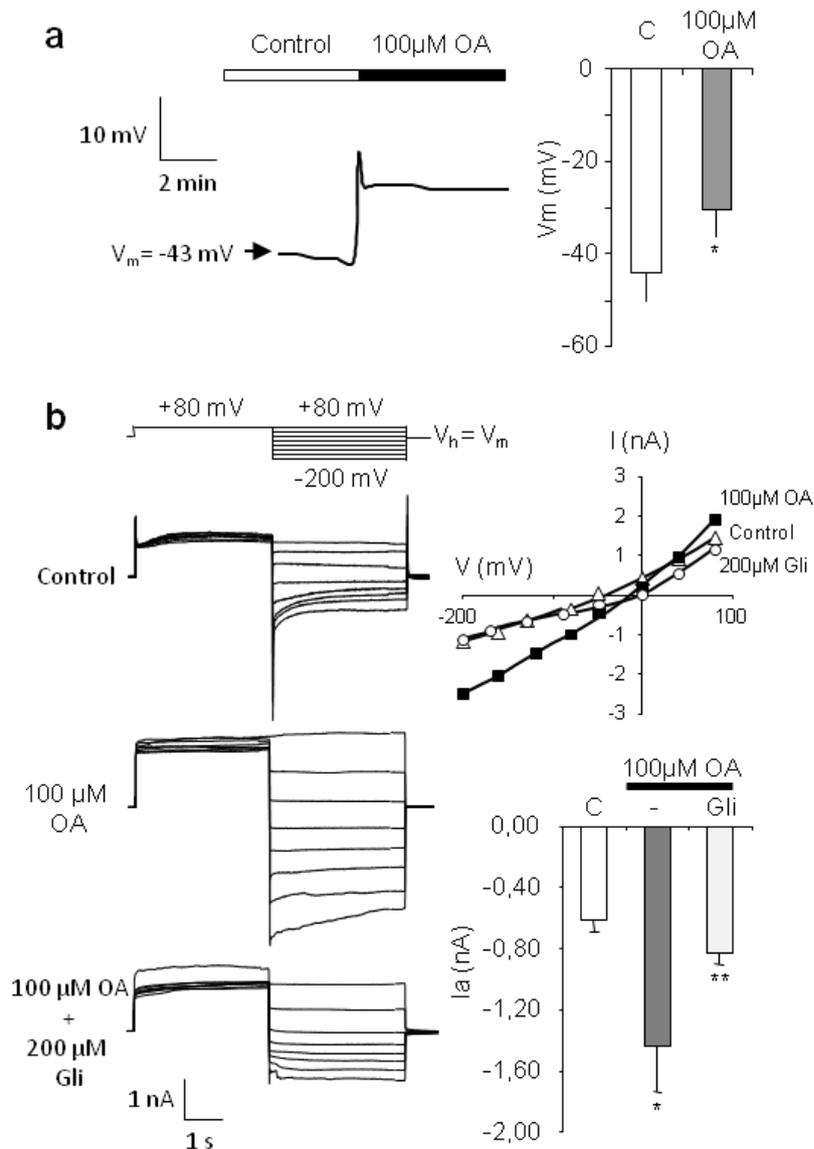


Figure 3. Oxalic acid-induced depolarization and anion current increase.

(a) Typical depolarization of a cultured cell in response to OA (left). Mean values of PM potentials before and after a 100 μM OA treatment (right). (b) Anion currents measured before and after 100 μM OA treatment, and after subsequent glibenclamide (200 μM) addition. The protocol was as illustrated, holding potential (V_h) was V_m (left). Corresponding current-voltage relationships at 6s (right up). Mean values of anion currents recorded at -200 mV and 6 s, after the 10 min pulse of 10 min of air with or without O_3 and with 200 μM of glibenclamide (right bottom). Recordings were done in the culture medium, main ions after 4d of culture: 9 mM K^+ , 11 mM NO_3^- (Reboutier et al., 2002). Data correspond to mean values \pm SD of at least 16 independent experiments. * and ** significantly different, $P < 0.05$.

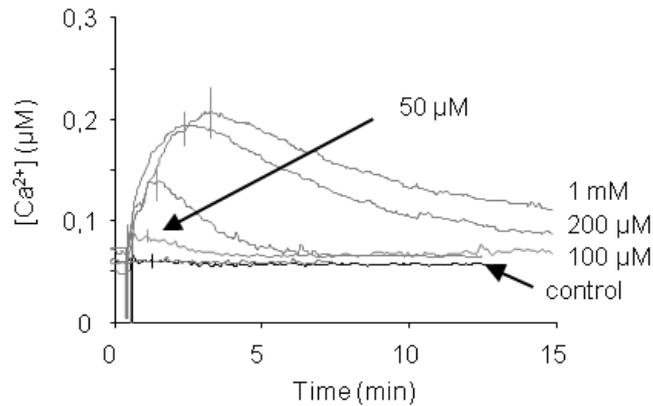


Figure 4. Oxalic acid-induced variations of cytosolic Ca²⁺ in *A. thaliana* cells.

Mean kinetics of [Ca²⁺]_{cyt} variation of aequorin expressing cells in response to OA at different concentrations. Data correspond to mean values of at least five independent experiments and error bars correspond to SE.

Oxalate-induced ROS generation in *A. thaliana* cultured cells.

The mechanism for generation of ROS, such as singlet oxygen (¹O₂), superoxide anions (O₂^{•-}) and hydrogen peroxide (H₂O₂), mediated via O₃ degradation in the apoplast, has been well documented and believed to be involved in the O₃-induced damages to biological systems (Sandermann et al., 1998). The case of plant cell damages via identical model was also reported (Kadono et al., 2010). Here, ROS generation was monitored by chemiluminescence of *Cypridina* luciferin analog (CLA), which specifically report the presence of O₂^{•-} and ¹O₂. Exposure of Arabidopsis cells to the micromolar concentrations of OA resulted in a rapid and dose dependent enhancement of the yield of CLA chemiluminescence (Fig. 5). Since CLA is responsive to both O₂^{•-} and ¹O₂, Tiron and DABCO, scavengers of O₂^{•-} and ¹O₂, respectively, were used to identify the member(s) of ROS involved (Kadono et al., 2010). Pretreatment of the cells with DABCO (5 mM) allowed a significant decrease in CLA-chemiluminescence while Tiron (5 mM) failed to give any impact (Fig. 5). Therefore, the rapid increase in CLA chemiluminescence induced in the presence of OA appeared to be reflecting the production of ¹O₂ rather than O₂^{•-} (Fig. 5).

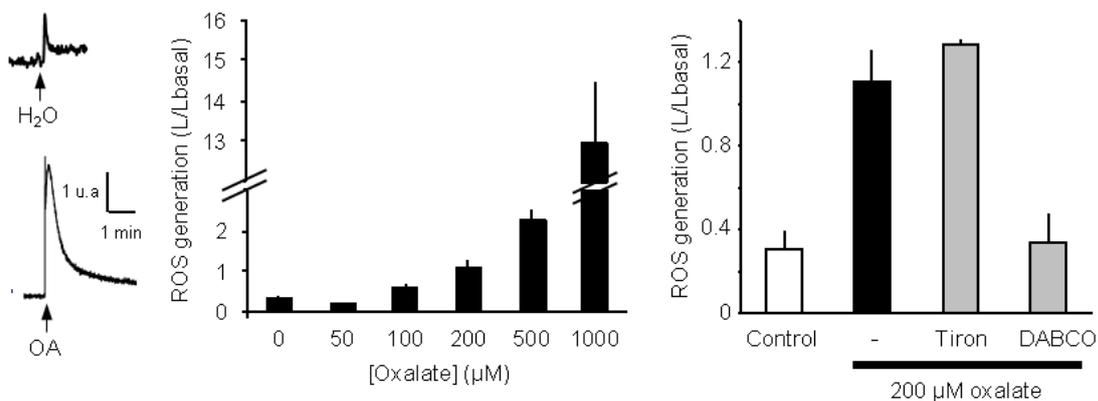


Figure 5. Oxalic acid-induced variations of ROS generation in *A. thaliana* cells.

Typical trace of ROS generation in cells after 200 µM OA treatment (left) and mean value of ROS generation after OA at 0, 50, 100, 200 and 500µM (center). The production of reactive oxygen species (ROS) was monitored by the chemiluminescence of the *Cypridina* luciferin analog (CLA, (Kadono et al., 2010)). Effect of DABCO and Tiron, scavengers of ¹O₂ and O₂^{•-} respectively, on ROS induced by 200 µM oxalate (left). Data correspond to mean values of at least five independent experiments and error bars correspond to SE.

Oxalate-induced cell death in A. thaliana cultured cells.

Millimolar concentrations of OA were shown to induce the PCD in *A. thaliana* cells (Errakhi et al., 2008). We checked if OA at micromolar concentrations was able to induce cell death. Indeed, a dose dependent cell death reaching about 20 % of the cell population with 500 μM OA was observed (Fig.6). These data support the hypothesis that OA can contribute to PCD increase in response to O_3 .

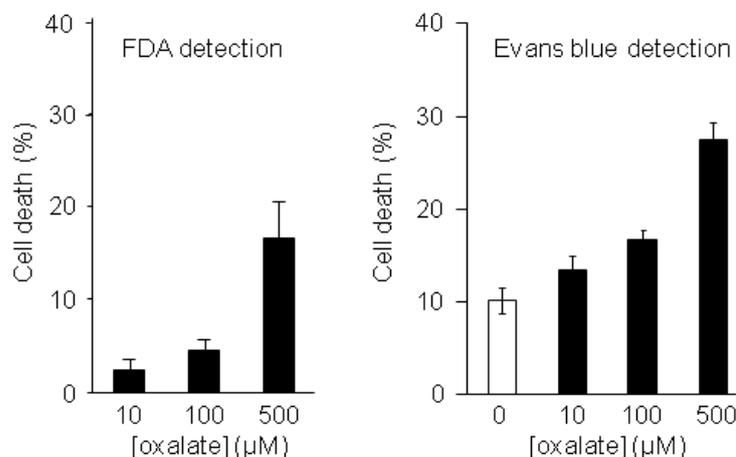


Figure 6. Oxalic acid-induced cell death in *A. thaliana* cells.

Effect of increasing concentrations of OA on FDA (left) and Evans blue (right) estimated cell viability after 24 h of treatment. Data reflect the means and SE of at least four independent experiments.

Discussion

Our working hypothesis was that OA could be produced upon AsA degradation during O_3 stress (Sandermann, 2008), and then participates to signaling pathways leading to O_3 -induced PCD. The AsA pool of the plant is currently considered to be an important part of the initial line of defense against oxidative stress (Foyer & Noctor, 2009) like those generated by O_3 (Sandermann, 2008). According to our hypothesis, we observed just after the 10 min of acute O_3 treatment a concomitant decrease of the total AsA pool and an increase of OA levels. The increase of OA level was more significant in the extracellular medium of *A. thaliana* cultured cells (Fig. 1). Moreover, determination of OA performed on seedlings has demonstrated the O_3 -dependent accumulation of OA in wild-type seedlings but not in *vtc 1-1*, a low-AsA maintaining mutant (Conklin et al., 2000), reinforcing the hypothesis on the role for AsA in the generation of OA upon O_3 exposure (Fig.2). As expected from the role of AsA as antioxidant, most of the AsA pool content was in fact DHA certainly because of a rapid oxidization of AsA during the O_3 pulse. Green and Fry (2005) showed that OA was generated from extracellular DHA degradation in cultured *Rosa* cells. However, we failed to detect a decrease in DHA in the external medium. Although, the transport of DHA to cytoplasm for reduction to AsA and transport back could be regarded as limiting step, it is noteworthy that in cultured cells the export of AsA from cytoplasm following H_2O_2 treatment could occur in a few minute (Parsons & Fry, 2010). Furthermore, in our cellular model, AsA level recovered the loss of the O_3 -induced degradation content by less than 20 min after the O_3 challenge (unpublished data) suggesting that the AsA/DHA

turnover was effectively efficient and quite rapid. Thus in our living cells continuously challenge by O₃ during 10 min, the dynamic fluxes of AsA/DHA could not allow having a quantitative estimation of the OA production from apoplastic DHA degradation. An efflux of OA from cytoplasm could also participate to increase in apoplastic OA since under abiotic stress condition OA efflux was also reported (Zheng, Yang, He, Yu, Zhang, You, Shen & Matsumoto, 2005). Indeed, different OA biosynthetic pathways exist within plant with glycolate oxidase or lactate deshydrogenase for example (Libert & Franceschi, 1987). Taken together, these data support the view that the degradation of the pool of AsA by O₃ results in micromolar concentrations of OA in *A. thaliana* cultured cells.

We thus analyzed how this generation of OA could be involved in early cellular events induced by O₃. We recently showed that an interplay between anion channel activation, [Ca²⁺]_{cyt} increase and ROS generation was an early prerequisite to the morphological and biochemical events participating to O₃-induced PCD in *A. thaliana* cells (Kadono et al., 2010). A rapid increase in anion current and a depolarization of the PM were recorded after treatment of cells with 100 μM OA, a concentration of the same range that the amount of OA released in our cultured cells upon O₃ treatment. The anion current increase was lower than the one previously reported with 6 mM OA (Errakhi et al., 2008), suggesting a dose dependent effect of OA on anion channel activity. This increase in anion currents was not an effect of pH shift due to OA, since the addition of OA adjusted to pH 5.8 (i.e. cell culture medium pH) induced the same increase in anion current (data not shown). The recorded anion currents shared the characteristic kinetic features of S-type anion channels, as shown previously in response to O₃ treatment (Kadono et al., 2010). The addition of glibenclamide, an anion channel inhibitor effective in *A. thaliana* suspension cells (Kadono et al., 2010), strongly reduced the OA-induced increase in anion current and PM depolarization as previously observed for O₃ (Kadono et al., 2010) thus suggesting the participation of same type of anion channel in both OA-induced process and O₃-induced process. The S-type anion channels were characterized and identified in guard cells (Schroeder & Keller, 1992, Vahisalu, Kollist, Wang, Nishimura, Chan, Valerio, Lamminmaki, Brosche, Moldau, Desikan, Schroeder & Kangasjarvi, 2008) where they provide the mechanism responsible for guard cell shrinkage leading to stomatal closure. As for guard cells, these channels may participate to O₃-induced shrinkage of the cells (Kadono et al., 2010). Cell shrinkage is a hallmark of animal apoptosis and PCD response in plant and the early regulation of channels allowing long term efflux of anions seemed to be a conserved event in both plant (Errakhi et al., 2008, Kadono et al., 2010) and animal (Okada, Shimizu, Maeno, Tanabe, Wang & Takahashi, 2006).

We further could record a [Ca²⁺]_{cyt} increase in response to OA in micromolar range (Fig. 4). Thus, despite the high affinity of OA for Ca²⁺ (Cessna, Sears, Dickman & Low, 2000), micromolar concentrations of OA could participate in O₃-induced increase in [Ca²⁺]_{cyt} previously reported in various models (Kadono et al., 2010, Kadono et al., 2006). We could also detect an increase in ROS generation upon OA treatment in the micromolar range (Fig. 5). The impact of OA on ROS generation is complex since OA could inhibit the production of H₂O₂ in tobacco and soybean cultured cells (Cessna et al., 2000) and increase ROS levels, this last event being correlated with PCD (Kim et al.,

2008). Generation of ROS was also described as an early cellular event induced by O₃ in our model (Kadono et al., 2010) and, it is noteworthy that ROS generation upon O₃ challenge could occur through various chemical and biological processes (Sandermann, 2008). According to the effect of DABCO, a scavenger of ¹O₂, the main ROS produced in response to 200 μM OA was ¹O₂. Generation of ¹O₂ in response to O₃ pulse was suggested in *Sedum album* L. leaves (Kanofsky & Sima, 1995) and observed in our model (Kadono et al., 2010). Finally, PCD being observed in response to O₃ as in response to millimolar concentrations of OA (Errakhi et al., 2008, Kim et al., 2008), we checked the impact of micromolar concentration of OA on cell viability. Our data are reminiscent of the dose dependent OA-induced cell death observed for millimolar concentrations in *A. thaliana* cells (Errakhi et al., 2008). We observed in a lowest extend, a dose dependent cell death in response to micromolar concentrations of OA (Fig. 6). In this range of concentration, the pH shift due to OA addition did not seem to participate to extent of cell death, since addition of OA adjusted at the pH 5.8 induced equivalent cell death in *A. thaliana* cells (Errakhi et al., 2008).

Previously, we suggested some O₃-induced signaling pathways leading to cell death (Kadono et al., 2010). Collectively, our present data strongly suggest that AsA reacting with O₃ could yield OA and, as a secondary toxicant, could thus induce different cellular events already described in O₃ responses. Therefore, by activating anion channel, producing ROS and favoring [Ca²⁺]_{cyt} increase, OA could fuel a cellular network of events participating to O₃ induced PCD.

Acknowledgements

T Kadono was supported by a grant from the JSPS and ML Molas by a grant from the Ministerio de Educacion de La Nacion Argentina.

References

- Cessna S.G., Sears V.E., Dickman M.B. & Low P.S. (2000) Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell*, 12, 2191-2200.
- Conklin P.L., Saracco S.A., Norris S.R. & Last R.L. (2000) Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics*, 154, 847-856.
- Eller A.S.D. & Sparks J.P. (2006) Predicting leaf-level fluxes of O₃ and NO₂: the relative roles of diffusion and biochemical processes. *Plant Cell and Environment*, 29, 1742-1750.
- Enami S., Hoffmann M.R. & Colussi A.J. (2008) Acidity enhances the formation of a persistent ozonide at aqueous ascorbate/ozone gas interfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7365-7369.
- Errakhi R., Meimoun P., Lehner A., Vidal G., Briand J., Corbineau F., Rona J.P. & Bouteau F. (2008) Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *J Exp Bot*, 59, 3121-3129.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal*, 11, 861-905.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol*, 155, 2-18.
- Green M.A. & Fry S.C. (2005) Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature*, 433, 83-87.
- Guo Z., Tan H., Zhu Z., Lu S. & Zhou B. (2005) Effect of intermediates on ascorbic acid and oxalate biosynthesis of rice and in relation to its stress resistance. *Plant Physiol Biochem*, 43, 955-962.

- Hedrich R., Busch H. & Raschke K. (1990) Ca^{2+} and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Embo J*, 9, 3889-3892.
- Kadono T., Tran D., Errakhi R., Hiramatsu T., Meimoun P., Briand J., Iwaya-Inoue M., Kawano T. & Bouteau F. (2010) Increased anion channel activity is an unavoidable event in ozone-induced programmed cell death. *PLoS One*, 5, e13373.
- Kadono T., Yamaguchi Y., Furuichi T., Hirono M., Garrec J.P. & Kawano T. (2006) Ozone-induced cell death mediated with oxidative and calcium signaling pathways in tobacco bel-w3 and bel-B cell suspension cultures. *Plant Signal Behav*, 1, 312-322.
- Kangasjarvi J., Talvinen J., Utriainen M. & Karjalainen R. (1994) Plant Defense Systems Induced by Ozone. *Plant Cell and Environment*, 17, 783-794.
- Kanofsky J.R. & Sima P.D. (1995) Singlet Oxygen Generation from the Reaction of Ozone with Plant-Leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 7850-7852.
- Kim K.S., Min J.Y. & Dickman M.B. (2008) Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Mol Plant Microbe Interact*, 21, 605-612.
- Libert B. & Franceschi V.R. (1987) Oxalate in Crop Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 926-938.
- Luwe M. (1996) Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L) leaves: Seasonal variations and responses to changing ozone concentrations in air. *Plant Cell and Environment*, 19, 321-328.
- Meimoun P., Vidal G., Bohrer A.S., Lehner A., Tran D., Briand J., Bouteau F. & Rona J.P. (2009) Intracellular Ca^{2+} stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*, 4, 830-835.
- Nakano M., Sugioka K., Ushijima Y. & Goto T. (1986) Chemiluminescence probe with Cypridina luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one, for estimating the ability of human granulocytes to generate O_2 . *Anal Biochem*, 159, 363-369.
- Okada Y., Shimizu T., Maeno E., Tanabe S., Wang X. & Takahashi N. (2006) Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *Journal of Membrane Biology*, 209, 21-29.
- Parsons H.T. & Fry S.C. (2010) Reactive oxygen species-induced release of intracellular ascorbate in plant cell-suspension cultures and evidence for pulsing of net release rate. *New Phytol*, 187, 332-342.
- Pell E.J., Schlagnhauser C.D. & Arteca R.N. (1997) Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum*, 100, 264-273.
- Polle A., Wieser G. & Havranek W.M. (1995) Quantification of Ozone Influx and Apoplastic Ascorbate Content in Needles of Norway Spruce Trees (*Picea-Abies* L, Karst) at High-Altitude. *Plant Cell and Environment*, 18, 681-688.
- Reboutier D., Bianchi M., Brault M., Roux C., Dauphin A., Rona J.P., Legue V., Lapeyrie F. & Bouteau F. (2002) The indolic compound hypaphorine produced by ectomycorrhizal fungus interferes with auxin action and evokes early responses in nonhost *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 15, 932-938.
- Reboutier D., Frankart C., Briand J., Biligui B., Rona J.P., Haapalainen M., Barny M.A. & Bouteau F. (2007) Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci*, 120, 3271-3278.
- Rutkowski M., Grzegorzczak K. & Greger J. (2004) Adaptation of the phosphotungstate method to determine reduced and oxidized vitamin C in blood plasma. *Z Naturforsch C*, 59, 762-767.
- Sanderemann H. (2008) Ecotoxicology of ozone: Bioactivation of extracellular ascorbate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366, 271-274.
- Sanderemann H., Ernst D., Heller W. & Langebartels C. (1998) Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science*, 3, 47-50.
- Schroeder J.I. & Keller B.U. (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5025-5029.

- Smirnoff N. & Wheeler G.L. (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35, 291-314.
- Vahisalu T., Kollist H., Wang Y.F., Nishimura N., Chan W.Y., Valerio G., Lamminmaki A., Brosche M., Moldau H., Desikan R., Schroeder J.I. & Kangasjarvi J. (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, 452, 487-491.
- Yang J.C. & Loewus F.A. (1975) Metabolic Conversion of L-Ascorbic Acid to Oxalic Acid in Oxalate-accumulating Plants. *Plant Physiol*, 56, 283-285.
- Zheng S.J., Yang J.L., He Y.F., Yu X.H., Zhang L., You J.F., Shen R.F. & Matsumoto H. (2005) Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiology*, 138, 297-303.

Chapitre 3

Rôle des canaux potassiques en réponse à l'ozone

3.1 Introduction

Après avoir mis en évidence l'activation et l'implication des canaux anionique en réponse à l'ozone lors de la PCD, dans ce chapitre, l'implication et le rôle des canaux potassiques a été recherché. L'efflux de K^+ au travers de canaux K^+ est un processus nécessaire à l'achèvement de la plasmolyse chez les cellules de garde comme lors du processus d'AVD en animal. Chez les cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana*, une activation retardée des canaux K^+ a pu être observée en réponse à l' O_3 . Cette activation provoque un efflux de K^+ probablement au travers de canaux shaker GORK. Leur activation semble dépendante du stress oxydatif généré par l'ozone et plus particulièrement de la production d'anions superoxide $O_2^{\cdot-}$. Cette activation semble dépendante d'une régulation post-transcriptionnelle qui impliquerait l'épissage du pré-ARN messenger permettant la synthèse des protéines GORK.

3.2 Post-transcriptional regulation of the GORK channel by $O_2^{\bullet-}$ participate to outward rectifying K^+ current increase during ozone induced cell death in *A. thaliana* cells.

Article 3: Daniel Tran, Sandra Navet, Joël Briand, Bernadette Biligui, Hayat El Maarouf-Bouteau, François Bouteau ;

“Post-transcriptional regulation of the GORK channel by $O_2^{\bullet-}$ participate to outward rectifying K^+ current increase during ozone induced cell death in *A. thaliana* cells.”

Article en préparation pour publication

Post-transcriptional regulation of the GORK channel by $O_2^{\bullet-}$ participate to outward rectifying K^+ current increase during ozone induced cell death in *A. thaliana* cells.

Daniel Tran^{1,§}, Sandra Navet¹, Bernadette Biligui¹, Joël Briand¹, Hayat El-Maarouf-Bouteau², François Bouteau¹

¹ Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, LEM, Institut de Biologie des Plantes, 91405 Orsay, France

² UPMC, UR5 – PCMP, 9 Quai St Bernard, 75005 Paris, France

§ Corresponding author: Daniel Tran

LEM, Université Paris Diderot, Institut de Biologie des Plantes, Bât 630, 91405 Orsay cedex, France

tel: 33 (0)169153315

fax: 33 (0)169153424

E-mail: daniel.tran@univ-paris-diderot.fr

Key words: *Arabidopsis thaliana*, GORK, ozone, cell death, reactive oxygen species

Abstract

Cell shrinkage is an ubiquitous and fundamental feature of PCD processes in animals and plants. Significant effluxes of intracellular ions e.g. K^+ and Cl^- , together with loss of cellular water underlie this process. In animal cells, involvement of K^+ channels in PCD, notably during apoptosis volume decrease, is well established but, in plant evidence of K^+ channel involvement in such process remains scarce. In this study, using *A. thaliana* cultured cells we highlighted the delayed activation of K^+ outward rectifying current after O_3 expositions leading to PCD. This delayed activation could be due to an unexpected $O_2^{\bullet-}$ post-transcriptional regulation of GORK channel during ongoing of O_3 -induced PCD.

Introduction

Ozone (O_3) is a major secondary air pollutant. It is known to be toxic for animals as well as for plants. Chronic exposures to low O_3 concentrations have a negative impact on crop yields by reducing photosynthesis and growth, and inducing premature leaf senescence in sensitive plants.¹ Acute transient O_3 exposures cause cell death, visible as O_3 lesions in the leaves that resembles the programmed cell death (PCD) associated with the hypersensitive response (HR).² Using *A. thaliana* cultured cells, we recently reported in response to acute O_3 exposition, a controlled cell death process displaying morphological cell shrinkage.³ The loss of cell volume or cell shrinkage is a single and fundamental exclusive feature of PCD processes consistently observed in all physiologic models.⁴ ⁶ It is unique in that it occurs in the absence of any osmotic imbalance and is largely independent of the insults.

In animal cells, cell shrinkage was proved to be a critical precedent molecular event that involved dysregulation of ionic status, water homeostasis, cytoskeletal reorganization and subsequent progression of apoptosis, e.g. caspase and nuclease activation. Significant effluxes of primary intracellular ions e.g. K^+ and Cl^- , together with loss of cellular water underlie the fundamental of 'apoptotic volume decrease' (AVD), in which each playing a role in creating a hypotonic environment within the cell and committing the cell to die. Various time course studies revealed that K^+ and Cl^- channels are being modulated prior to apoptosis, resulting in the release of solute and water.^{4,7} Although apoptosis is the best defined form of animal PCD, a real apoptosis in itself, cannot occur in plant cells.^{5,6} In *A. thaliana* cells, acute O_3 exposition induced, in addition of cell shrinkage, an activation of anion channels³ reminiscent of what was observed during AVD. Potassium loss was described as a critical step in inducing PCD in response to ceramide and palmitic acid in tobacco cells.⁸ Although no direct evidence are available in plant on K^+ currents mediating K^+ efflux, K^+ channel inhibitors could prevent the K^+ loss, attenuates cell shrinkage and subsequent morphological and biochemical events of PCD in plant⁸ as in animal cells.^{4,9} The fact is that K^+ efflux consistently leads to PCD in animal cells, regardless of the identity of the inducer and the type of K^+ channels involved in animal cells,⁴ and in plant^{8,10} it possibly suggests that K^+ channel activation could also be a critical step in plant PCD.

In *A. thaliana* plasma-membrane (PM), diverse classes of potassium channels differing in their voltage dependence and kinetic properties have been found,¹¹ among others, two were described to strongly rectify outwardly, thereby mediating K^+ efflux, the SKOR and GORK channels.¹²⁻¹⁴ GORK dependent K^+ efflux were involved in NaCl-induced PCD.¹⁰ An inward rectifying K^+ channel, AKT2, could also be responsible for K^+ efflux from plant cells since this channel could function as a K^+ -selective 'open leaks' in the physiological range of membrane potential after phosphorylation by protein kinase A.¹⁵ In animal cells, K^+ leak channels, such as TASK, TALK, and TWIK channels, have been reported to play an important role in the loss of K^+ and apoptosis in different models.⁴ Non selective cation channels (NSCC) could also allow K^+ efflux and participate to plant cell death process,¹⁶ but at this time their exact molecular identities are still unraveled.

Recent studies show that K^+ channels can be regulated by ROS. Potassium current through the heterologously expressed SKOR is modulated by H_2O_2 , thereby indentifying the K^+ channel as a potential target for ROS.¹⁷ Hydroxyl radical-activated K^+ channel responsible for K^+ efflux from root cells were also described during stress accompanied by ROS generation.¹⁰ This efflux was not recorded in the *gork1-1* mutant, suggesting that GORK channel is also ROS sensitive.¹⁰ The primary site of O_3 interaction within plant cells is the apoplast where O_3 breaks down into various reactive oxygen species (ROS) namely hydrogen peroxide, singlet oxygen and hydroxyl radicals. We have therefore investigated plant K^+ efflux channel regulation in O_3 -induced cell death in *A. thaliana* cells. Plant cultured cells are widely used for abiotic stress and HR elicitor research, and many details of their underlying mechanisms are well studied.^{3,18-22} In the present work, we used the dSEVC to record ion currents through *A. thaliana* cell PM after O_3 treatment. By preserving the cell wall, the dSEVC technique enables recordings from the cells in conditions nearest to physiological. Importantly, time and voltage dependent outward K^+ channels (KORC) expressed in PM of *A. thaliana* cells have been described and characterized pharmacologically.²³⁻²⁶ It was found that an O_3 challenge induced a delayed activation of KORC participating to O_3 induced cell death in a ROS dependant manner. Our data further suggest that ROS could up-regulate KORC activity through a post-transcriptional mechanism.

Results

K^+ channel inhibitors reduced ozone-induced cell death

We recently have shown that a short (10 min) acute O_3 treatment induces in *A. thaliana* suspension culture a large cell death displaying hallmarks reminiscent of AVD.³ The percentage of dead cells increased progressively and reached a plateau of 80% of dead cells after about 2 h.³ Since K^+ channel inhibitors are known to decrease AVD process in animal cells,^{4,9} we thus searched for putative impact of K^+ channel activity on O_3 -induced cell death by pre-treating the cells before O_3 challenge with 10 mM of TEA or Cs^+ , two well known K^+ channel inhibitors efficient in our model. Both inhibitors allowed decreasing significantly the extent of cell death recorded 2 h after O_3 treatment, Cs^+ being the more efficient (Figure 1). These data strongly suggest the involvement of K^+ channels in O_3 -induced cell death as expected from an AVD like process.

Ozone induces delayed outward K^+ channel activation

By using microelectrode-voltage clamp technique and pharmacological analysis, we thus searched for putative K^+ current regulation in response to O_3 . Air treated cells (10 min), used as control, present a resting membrane potential (V_m) values of -35 ± 2 mV (n=22) 5 min after treatment and of -34 ± 4 mV (n=9) 2h after treatment, close to control V_m value without treatment, -34 ± 2 mV (n=23), and in the same range of previous studies.^{3,24} A 10 min O_3 pulses induced in all tested cultured cells a rapid depolarization to -16 mV \pm 2 mV (n=25) due to a large activation of anion channels (Figure 2a), as we recently reported.³ Although the experimental protocols allow us to

record whole cell ion currents simultaneously, activation of K^+ channels was not recorded in the same early time scale.

We thus checked if the effect of O_3 treatment on K^+ channel modulation could be delayed. Two hours after treatment, 3 out of 14 cells showed an anion current profile and depolarized state, resembling those recorded a few minutes after O_3 treatment (Figure 2a center,³), while 11 out of 14 cells presented time dependent outward rectifying currents and were hyperpolarized to -56 mV (Figure 2a right). The mean V_m of these cells was closed to the equilibrium potential estimated for K^+ in our conditions ($E_{K^+} = -60$ mV, $[K^+]_{out} = 9$ mM 24 with $[K^+]_{in}$ estimated at 100 mM), as previously reported in *A. thaliana* cultured cells displaying mainly KORC.²⁴ These outward rectifying currents present, after leak subtraction, typical rectification for voltage positive to -40 mV and were sensitive to the K^+ channel blockers TEA and Cs^+ (Figure 2b-c). The biophysical and pharmacological hallmarks of these time- and voltage-dependent outward rectifying currents are reminiscent of the KORC characteristics reported in cultured cells and guard cells²⁶⁻²⁸ and for GORK and SKOR channels.^{12,13} Thus a short O_3 pulse could induce a delayed activation of KORC on our model.

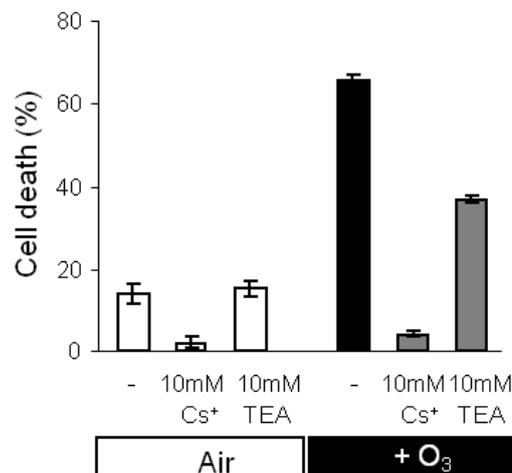


Figure 1. O_3 -induced cell death in *A. thaliana* cultured cells is dependent on K^+ channel inhibitor.

Cell death was induced by exposing the cell suspensions to a 10 min pulse of ozonized air. Controls correspond to a 10 min pulse with air only. For each treatment, cells were then incubated for 6 h, before cell staining with Evans blue and subsequent counting. Pretreatment of cells with TEA-Cl or CsCl (10 mM each) were done 15 min prior of air or O_3 exposure. The data correspond to means of at least 4 independent replicates and error bars correspond to SE.

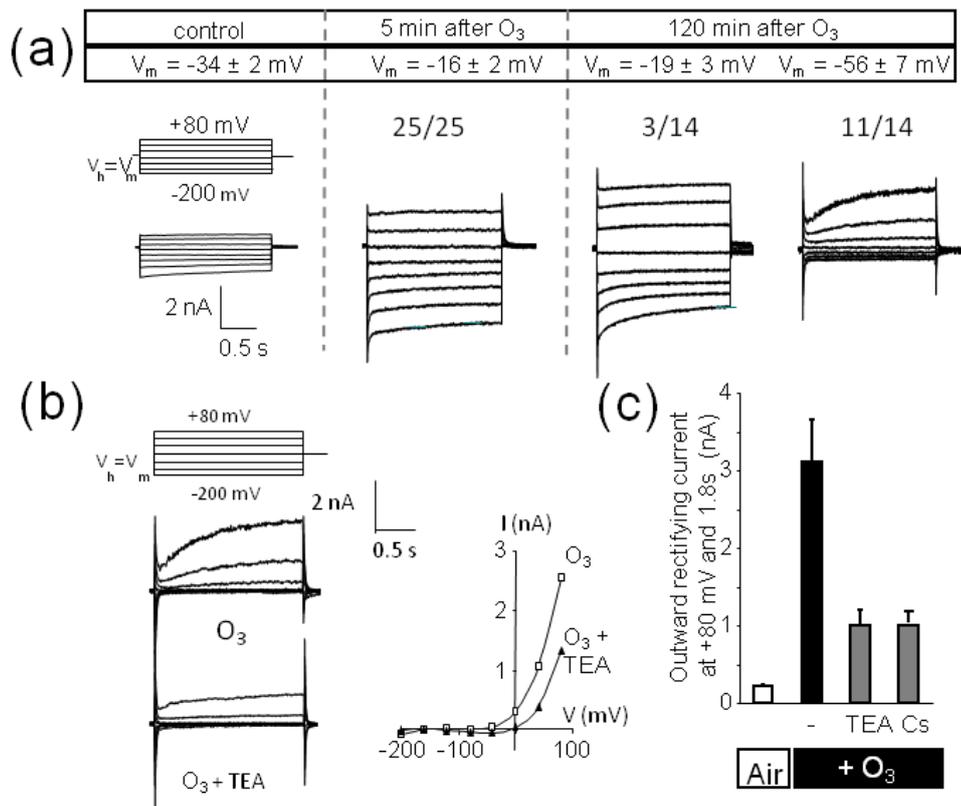


Figure 2. Ozone-induced delayed activation of outward rectifying K^+ currents in *A. thaliana* cultured cells.

(a) Mean polarization and typical currents recorded for cultured cells before, and 5 and 120 min after O_3 exposure. (b) Outward rectifying current (leak subtracted) measured 120 min after O_3 exposure, before and after addition of 10 mM TEACl and corresponding current-voltage relationships at 1.8 s. The protocol was as illustrated, holding potential (V_h) was V_m . (c) Mean values of outward rectifying current (recorded at +80 mV and 1.8 s) recorded 120 min after the pulse of O_3 for cells pretreated or not with TEACl or CsCl (10 mM each). Data correspond to mean values \pm SD of at least six independent experiments.

At intermediary times after O_3 pulse, cells displayed various pattern of ion currents. For example, 30 min after O_3 treatment, 7 out of 15 cells presented currents displaying hallmarks of anion currents mixed with various intensities of time dependent outward currents (Figure 3a left) and a mean polarization of $-30,5 \text{ mV} \pm 3,4 \text{ mV}$ ($n=7$). The other half (8 out of 15) presented an outward rectifying current (Figure 3a right) resembling KORC although an instantaneous component could be observed (Figure 3a right). This instantaneous component of KORC could be due to opened channels at the membrane potential, these cells presenting a mean V_m value of $-41,6 \text{ mV} \pm 2,7 \text{ mV}$ ($n=8$) positive to expected E_{K^+} . Figure 3b shows the changes in current voltage relationships after O_3 treatment illustrating the progressive shift from anion conductance to KORC conductance observed for most of the cells. Taking advantage of the cells displaying mainly KORC, we followed the KORC intensity upon time after O_3 treatment (Figure 3c). KORC increased progressively during the 2 h after O_3 exposure (Figure 3c). Thus in response to O_3 , anion channels are rapidly activated leading to a large depolarization allowing KORC activation, and upon KORC increase, in some cells anion currents are sustained when for other cells the anion currents progressively decrease leading to a second hyperpolarized population presenting only KORC.

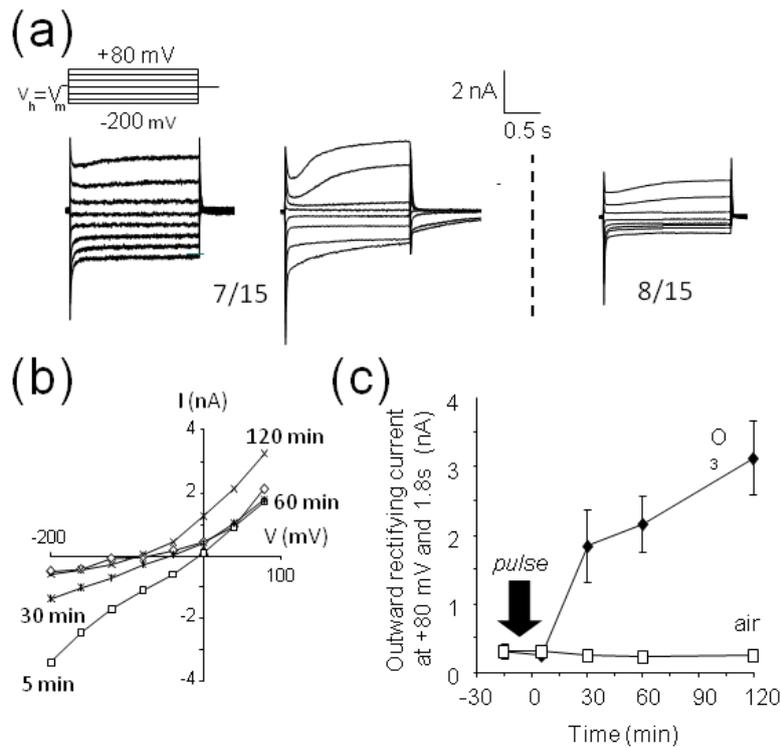


Figure 3. Ozone-induced currents in *A. thaliana* cultured cells at intermediary times.

(A) Typical currents recorded for cultured cells 60 min after O_3 exposure. The protocol was as illustrated, holding potential (V_h) was V_m . (B) Whole cell current-voltage relationships (at 1.8 s) of the main current signatures at different times after O_3 exposure. (C) Time course of mean values of outward rectifying current (recorded at +80 mV and 1.8 s) after the pulse of O_3 . Data correspond to mean values \pm SD of at least 8 independent experiments.

Ozone induces a ROS dependent activation of KORC

In addition to PM depolarization, ROS were reported to activate SKOR and GORK currents in plant cells.^{10,17} The generation of ROS, such as superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), occur from O_3 degradation in the apoplast and NADPHoxidase activation.²⁹ We followed in our cultured cells the ROS generation upon the 2 hours following the acute exposition to O_3 to check if ROS are produced when KORC is activated. ROS generation was monitored by *Cypridina* luciferin analog (CLA) chemiluminescence that reports the presence of $O_2^{\bullet-}$ and by luminol for H_2O_2 . Exposure of *Arabidopsis* cells to a 10 min pulse of O_3 resulted in a rapid large enhancement of the CLA chemiluminescence yield followed by a slow decrease upon the 2 following hours (Figure 4a). Pretreatment of the cells with Tiron (5 mM), a scavenger of $O_2^{\bullet-}$, completely abolished the O_3 -induced CLA-chemiluminescence indicating that $O_2^{\bullet-}$ was the main ROS generated from O_3 . Diphenyleneiodonium chloride (DPI, 10 μ M), an inhibitor of the NADPH-oxidase, failed to decrease the immediate enhancement of CLA-chemiluminescence, but induced a more rapid decrease in ROS along time (Figure 4a), suggesting that NADPH-oxidases participated to the sustained $O_2^{\bullet-}$ level. A slightly delayed chemiluminescence increase was also reported after O_3 treatment in the presence of luminol reflecting the production of H_2O_2 (Figure 4b), probably mediated by superoxide dismutase as observed on tobacco cells challenged by O_3 .²² We therefore checked if ROS could be involved in O_3 -

induced KORC by pre-treating the cells with Tiron (5 mM), or DPI (10 μ M), 15 min before the 10 min O_3 pulse. Two hours after O_3 treatment, KORC were drastically reduced in cells pretreated with Tiron and DPI (Figure 4c) indicating that at least the sustained ROS generation (inhibited by DPI) could participate to KORC activation. However, the time course of KORC increase was not strictly correlated with ROS generation since after 1h, KORC goes on increasing (Figure 3c) when ROS level fall down (Figure 4a-b). This prompted us to investigate on other putative level of regulation.

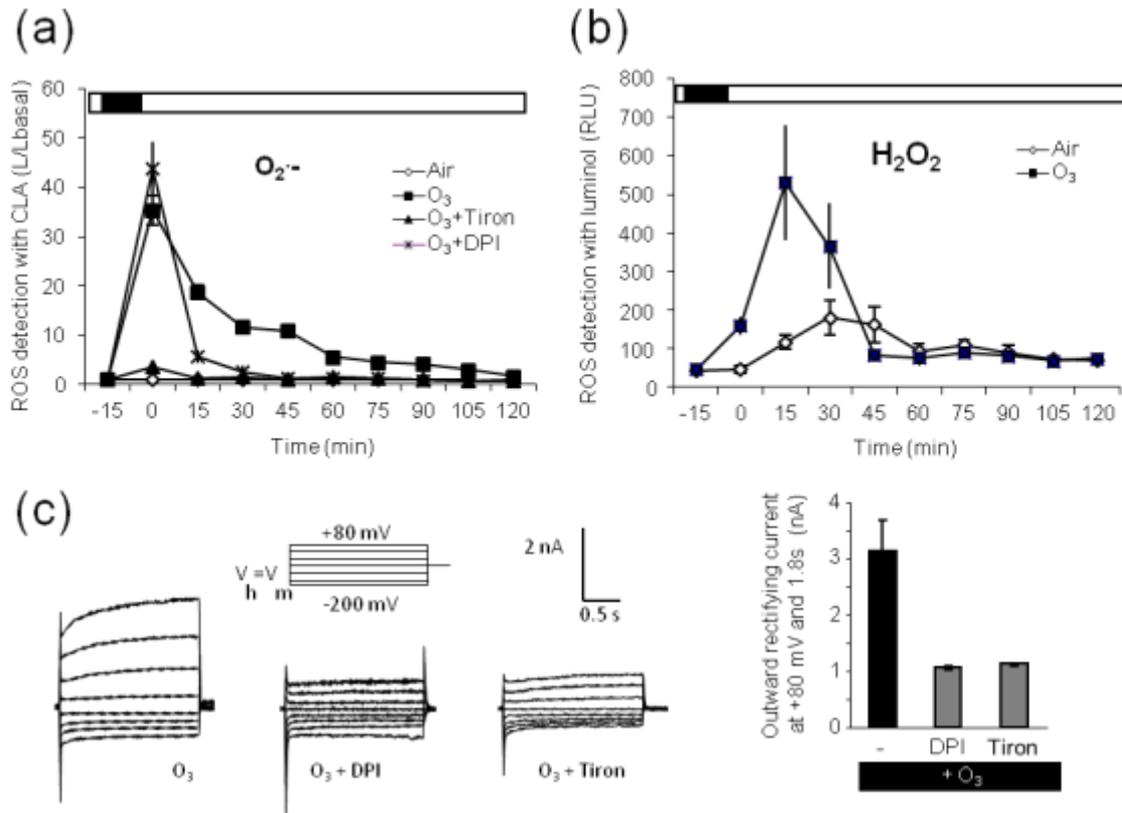


Figure 4. Ozone-induced ROS generation in *A. thaliana* cultured cells and their effect on KORC.

(A) Time course of ROS generation after O_3 exposure detected with Cypridina luciferin analog (CLA) with or without pretreatment (15 min prior to O_3 exposure) with the $O_2^{\cdot -}$ scavenger Tiron (5 mM), or NADPHoxidase inhibitor, DPI (10 μ M). (B) Time course of ROS generation after O_3 exposure detected with luminol. Controls correspond to a 10 min pulse with air only. Data reflects the mean and SE of 4 independent experiments. (C) Effect of pretreatments with Tiron (5 mM) or DPI (10 μ M) 15 min prior to O_3 exposure on KORC. The protocol was as illustrated, holding potential (V_h) was V_m . Corresponding mean values of outward rectifying current (recorded at +80 mV and 1.8 s) recorded 120 min after the pulse of O_3 . Data correspond to mean values \pm SD of at least 6 independent experiments.

Ozone induced a ROS dependent post-transcriptional regulation of GORK

In animal model during AVD, the shaker outward K^+ channels Kv1-3 is regulated at transcriptional level in a few hours.³⁰ In plant, GORK channels were also shown to be regulated at transcriptional level upon onset of drought, salt stress and cold.³¹ We thus searched for putative transcriptional regulation of the K^+ channels responsible for K^+ efflux from the cells in response to O_3 . We analyzed transcript levels of *GORK*, *SKOR* and *AKT2*, K^+ channels described in *A. thaliana* which

could be responsible for K^+ effluxes. Transcripts of *SKOR* and *AKT2* were not detected neither in control condition either after O_3 challenges of the cells, when GORK channel transcript level increased in a time dependent manner after O_3 treatment (Figure 5).

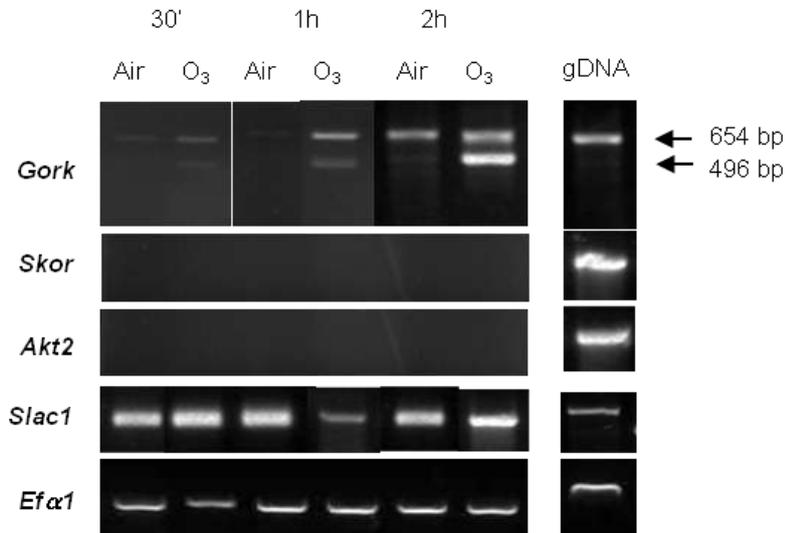


Figure 5. Effect of O_3 on K^+ channel genes transcription.

Effect of O_3 on the transcription of the K^+ channel genes, *GORK*, *SKOR* and *AKT2* and anion channel gene *SLAC1*. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with RNA extracted 30 min, 1 h and 2h after the 10 min O_3 or air pulses. *EfaA4* was used as a housekeeping gene. Results are representative of at least 4 biological replicates.

Interestingly, PCR experiments highlighted the presence of two bands after O_3 treatment (Figure 5). Cloning and sequencing of the cDNAs confirm that both two corresponded to GORK gene (At5g37500.1). The heavier band possessed the 10th and 11th introns, corresponding to GORK gene from nucleotide 4698 to 5351 (Figure 5, 654 bp), when the smallest was the corresponding mRNA without introns (Figure 5, 496 bp). Thus, in our model, in control condition or upon air treatment most of the *GORK* pre-mRNA was not processed, and the splicing of *GORK* pre-mRNA occurred only after the O_3 treatment in a time dependent manner (Figure 5). To verify this, we used a second set of primers allowing working on a part of the *GORK* gene comprising introns 5 to 9 (bases 3425 to 4840). In the same manner, two bands were revealed on PCR gels only after O_3 treatment (*not shown*). The heavier band presented the fives introns (1406 bp), when the smallest corresponded to mRNA (913 bp). To ascertain the specificity of this post-transcriptional regulation, we further checked for the transcription profile of the O_3 sensitive anion channel *SLAC1*,³² which could be responsible for early activated anion current, as a positive control. We could not observe such post-transcriptional regulation for *SLAC1* mRNA, which was constitutively expressed in our cells (Figure 5).

Among post-transcriptional mechanisms, several lines of evidence indicate that glycine rich RNA-binding proteins (GR-RBPs) have a crucial role in the regulation of pre-mRNA splicing.³³ Expression of some GR-RBPs could be up-regulated by O_3 ³⁴ and various ROS generating abiotic stress.^{33,35} In our model, the *GR-RBP1* and *GR-RBP7* transcript level was effectively increased in 2 h after the 10 min O_3 pulse (*not shown*). We thus checked for the impact of pharmacology efficient on

O_3 -induced ROS on *GORK* pre-mRNA splicing. Upon treatment with 5 mM Tiron, which impaired $O_2^{\bullet-}$ generation in response to O_3 (Figure 4a), only pre-mRNA was observed, indicating that *GORK* splicing was abolished (Figure 6a). With 10 μ M DPI the splicing was also inhibited (Figure 6b). Since after O_3 challenge a part of the $O_2^{\bullet-}$ is probably dismutated in H_2O_2 (Figure 4b), control cells were treated directly with H_2O_2 (500 μ M) to assess its effect, if any, on *GORK* pre-mRNA processing. In this condition only the pre-mRNA was observed (Figure 6b), indicating that H_2O_2 was not efficient to induce *GORK* splicing. To further check for the role of $O_2^{\bullet-}$ on *GORK* pre-mRNA splicing, we tested the impact of methylviologen (MV) known to catalyze mainly the formation of superoxide free radicals.^{36,37} Upon treatment of the cells with 100 μ M MV, *GORK* mRNA was correctly spliced (Figure 6b). As observed with O_3 , pretreatment of the cells with Tiron or DPI before MV application allowed reversing the phenomenon, most of the pre-mRNA being not spliced (Figure 6b). Altogether, these data strongly suggest a role for $O_2^{\bullet-}$ in *GORK* splicing regulation.

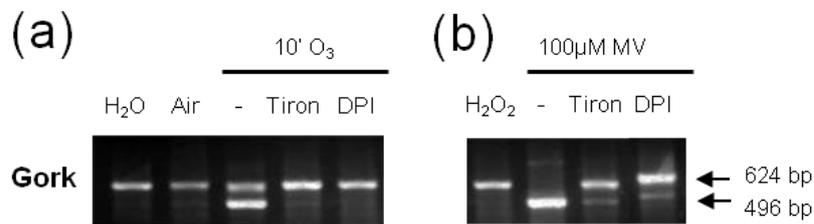


Figure 6. Effect of ROS pharmacology on *GORK* gene splicing.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed with *GORK* RNA extracted (A) 2h after the 10 min O_3 exposure or (B) 4h after a 100 μ M methyl viologen (MV) treatment, with or without pretreatments with Tiron (5 mM) or DPI (10 μ M) 15 min prior to O_3 or MV treatments. *EF1αA4* was used as a housekeeping gene. Results are representative of at least 3 biological replicates.

Discussion

In the present work, pharmacological analysis and single electrode voltage-clamp technique were used to reveal the contribution of K^+ channels expressed in *A. thaliana* cultured cells toward PCD caused by O_3 (Figures 1 and 3). Large ROS generation (Figure 4) and depolarization due to anion channel activation occurred immediately after O_3 exposure (Figure 2), as previously described.³ Despite these conditions favorable for KORC activation,^{10,17,27} we failed to record early KORC activity but recorded a delayed gradual increase in KORC activity (Figure 3). Although expected from rapid stomatal closure triggered by short O_3 pulse,³⁸ Torsethaugen et al. (1999) also failed to record rapid KORC increase in guard cell protoplasts exposed to O_3 , when inward K^+ current were reduced. This suggests a more complex regulation level for KORC activation. The KORC recorded in our study presents the same biophysical (voltage and time dependence) and pharmacological hallmarks than the one previously described.^{23,24,26} Based on the absence of *SKOR* mRNA and presence of *GORK* mRNA (Figure 5), and on biophysical hallmarks of the O_3 -induced outward current, *GORK* is the best K^+ channel candidate to be responsible for the KORC increase recorded in response to O_3 , although

we cannot exclude involvement of NSCC.¹⁶ The lack of *AKT2* mRNA is in accordance with our electrophysiological data since the outward rectifying hallmarks of the current we recorded in response to O_3 (Figure 2a) did not fit with *AKT2* functioning as a K^+ -selective 'open leaks'.¹⁵ The GORK channel was suggested to be responsible for hydroxyl radical-activated K^+ current responsible for K^+ efflux from root cells during stress accompanied by ROS generation.¹⁰ Hydroxyl radicals could be generated from $O_2^{\bullet-}$ or H_2O_2 through Haber-Weiss or Fenton reactions or cell wall bound peroxidase activity.^{39,40} Thus, in our model hydroxyl radicals are certainly generated from the O_3 -generated $O_2^{\bullet-}$ or H_2O_2 (Figure 4a-b). However, hydroxyl radical half-life time is very brief thus these radicals should have induced a rapid KORC increase, since we observed a large ROS generation just after O_3 exposure (Figure 4). Hydroxyl radicals would not be the only events/component responsible for sustained increase in KORC activity we observed (Figure 3d), since ROS generation was largely decreased 1h after O_3 exposure (Figure 4) when increase of KORC continues. This sustained KORC activity was effectively more probably due to transcriptional up regulation of *GORK* gene (Figure 5), as observed for K^+ and chloride channels during the onset of apoptosis in some animal cells.³⁰ However, an additional level of regulation was revealed in our model since a ROS dependent post-transcriptional regulation also occurs allowing availability of *GORK* mRNA (Figures 5 and 6). Effectively, only *GORK* pre-mRNA (ie. with the introns) were detected on our cells in control conditions and upon air treatment, which could explain the lack of KORC observed in control conditions upon electrophysiological recording during this set of experiments. However, we cannot overlook the threshold detection of PCR experiments. After O_3 exposure, a time and $O_2^{\bullet-}$ dependent splicing of *GORK* pre-mRNA was observed (Figure 6). The dependence on $O_2^{\bullet-}$ and no other ROS was evidenced by the inhibition of the pre-mRNA splicing by the $O_2^{\bullet-}$ scavenger Tiron and the absence *GORK* pre-mRNA splicing upon direct H_2O_2 treatment. This was further confirmed with MV, which catalyzes the formation of superoxide free radical^{36,37} and was able to induce the pre-mRNA splicing of *GORK* channel. The inhibition of the pre-mRNA splicing, in both O_3 and MV, treated cells, by the NADPHoxidase inhibitor, DPI, further suggests that the biological sustained $O_2^{\bullet-}$ production (Figure 4a) was necessary in this process. This is reminiscent with previous studies showing that a minimal time exposure to ROS was required to enable transcription and translation,³⁹ and numerous expression profiling microarray have suggested alternative splicing during ozone stress.^{41,42}

Several lines of evidence suggested that is governed by GR-RBPs.³³ In our model, the *GR-RBP1* and *GR-RBP7* pre-mRNA processing transcript level was effectively increased after O_3 exposure in the range of time when pre-mRNA splicing occurs. Up-regulation of *GR-RBP* transcripts was also revealed in a transcriptomic analysis of various cultivars of *Medicago truncatula* exposed to acute O_3 concentrations.³⁴ Moreover, expression of these *GR-RBPs* was shown to be strongly up-regulated by various ROS generating abiotic stress such as cold, NaCl or drought.³⁵ Although further data are thus needed to reveal the putative role of GR-RBPs in O_3 response, the *GR-RBP7* was already shown to be regulated by oxidative stress⁴³ and analysis of the distal region of *GR-RBP1* gene revealed several *cis*-acting elements including an 'ARE domain' (antioxidant response element) known to be responsiveness to ROS (Supplementary Figure S1).

After acute O_3 exposition, upon KORC increase, anion currents remained sustained in some cultured cells (Figure 3), when for other cells the anion currents progressively decrease leading to a second hyperpolarized population presenting only KORC. It is noteworthy that 2 h after O_3 exposure, 75 % of the cells are already dead (Figure 1) but our electrophysiological technique only allows working on non plasmolysed living cells. Thus, the major cell population displaying only KORC after 2 h certainly reflects the behavior of the 25% of living cells more than the one of dying cells. However, the fact that the K^+ channel blockers, TEA and Cs^+ efficient to reduced KORC activity (Figure 2) also reduced O_3 -induced cell death (Figure 1) indicates that KORC are probably activated in the cells undergoing cell death. We assume that most of the cells exposed to O_3 in our study are subjected in addition of ROS generation, to an early but sustained anion channel activation allowing the depolarization of the cells, followed by a sustained KORC activation. Several early studies on apoptosis and ions have suggested cellular depolarization as an early event coinciding with AVD, chloride being the main ion responsible for the change in membrane potential during the later stages of apoptosis.⁴ In such situation, the progressive death of the cells displaying both currents nicely explains the increasing proportion of *A. thaliana* cells displaying only KORC after the O_3 exposure (Figure 3). However, the increase in KORC and anion channel activity should be responsible for the loss of ions and water leading to cell shrinkage and cell death progress after acute O_3 exposure.

In conclusion, our data highlight the probable contribution of GORK currents to achieve the cell shrinkage observed for *A. thaliana* cultured cells during O_3 -induced PCD. These data are reminiscent of what was observed in numerous animal models during AVD^{4,7,30} and with the K^+ loss observed during cell shrinkage and subsequent PCD in tobacco protoplasts submitted to ceramide or palmitoleic acid.⁸ Further studies will be needed to ascertain the putative role of GORK mediated K^+ efflux for creation of a specific low- K^+ intracellular micro-environment, which could assists activation of proteases (metacaspases), endonucleases and subsequent events leading to PCD in plant. However, the use of *A. thaliana* cultured cells allows us to describe an unexpected $O_2^{\bullet -}$ post-transcriptional regulation level of GORK channel during ongoing of O_3 -induced PCD.

Material and methods

Cell culture conditions

For this study, *Arabidopsis thaliana* L. (ecotype Columbia) suspension-cultures were freshly prepared from callus and maintained as previously described.³ *A. thaliana* suspension cells were grown in Gamborg medium (pH 5.8). They were maintained at $22 \pm 2^\circ C$, under continuous white light ($40 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$) and continuous shaking (gyratory shaker at 120 rpm). Cell suspensions were sub-cultured weekly using a 1:10 dilution. All experiments were performed at $22 \pm 2^\circ C$ using log-phase cells (4 days after sub-culture).

Ozone exposure

Ozone exposure of the cell suspension was performed as previously described.³ Ozonized air (0.1 L/min; 10 mg O_3 /h) was passed on the surface of the cell suspensions (250 μ L in 4 mL tubes). By this way the cells could be exposed to the pulse of O_3 for 10 min. Ozone was generated by a ceramic ozonizer (NAVI Super Ceramics Ozonizer EO mini, Kenis Kagaku Kyoisha Ltd., Tokyo, Japan), equipped with an air pump. Controls were systematically performed by exposing cells to an equivalent air flux in the same condition.

Cell viability assays

Cell viability was assayed using the vital dye, Evans blue, after air or ozone treatment with or without the appropriate pharmacological effectors (pretreatment of 15 min prior O_3 exposure). Cells (100 μ L) were incubated for 5 min in 1 ml phosphate buffer pH 7 supplemented with Evans blue to a final concentration of 0.005%. Cells that accumulated Evans blue were considered dead. At least 1000 cells were counted for each independent treatment and repeated at least 4 times for each condition.

Electrophysiology

Individual cells were impaled and voltage-clamped in the culture medium using an Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) for discontinuous single electrode voltage clamp experiments as previously described. Voltage and current were digitized using a computer fitted with a Digidata 1320A acquisition board (Axon Instruments). The electrometer was driven by pClamp software (pCLAMP8, Axon Instruments). Experiments were conducted on 4-day-old cultures at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (main ions in the medium after 4d of culture: 9 mM K^+ , 11 mM NO_3^- ,²⁴).

Monitoring of ROS Production

The production of $O_2^{\cdot -}$ was monitored by the chemiluminescence of the *Cypridina* luciferin analog (CLA) as previously described.^{3,22} Chemiluminescence from CLA was monitored using a FB12-Berthold luminometer (with a signal integrating time of 0.2 s). For the statistical analysis of the data, the luminescence ratio (L/L_{basal}) was calculated by dividing the luminescence intensities of CLA-luminescence (L) with the luminescence intensity before air or ozone treatment (L_{basal}).

RT-PCR of gene expression

Four-day-old cells were treated with O_3 , harvested and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted with Trizol reagent[®] protocol (Invitrogen). RNA was treated by the Deoxyribonuclease I Kit (Sigma). Total RNA was quantified with a nanodrop and their integrity checked on denaturing agarose gels. Total RNA (2 μ g) was converted into first-strand cDNA with the Superscript[™] II Rnase H-Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and oligo(dT) primers. One μ l of cDNA was amplified in a 20 μ l PCR mixture. gork, skor, akt2 and Slac1 primers were designed according to^{43,44}. Two couples of primers were used for gork (Supplementary Table 1). Control PCR was performed using the housekeeping gene EF1 α 4. Thermal cycling conditions were as follows: an initial denaturation step at 94°C 2 min, followed by 34 cycles (or by 26 cycles for EF1 α 4), of 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min 30 s, and ending with a single step at 72°C 10 min. PCR products were separated by

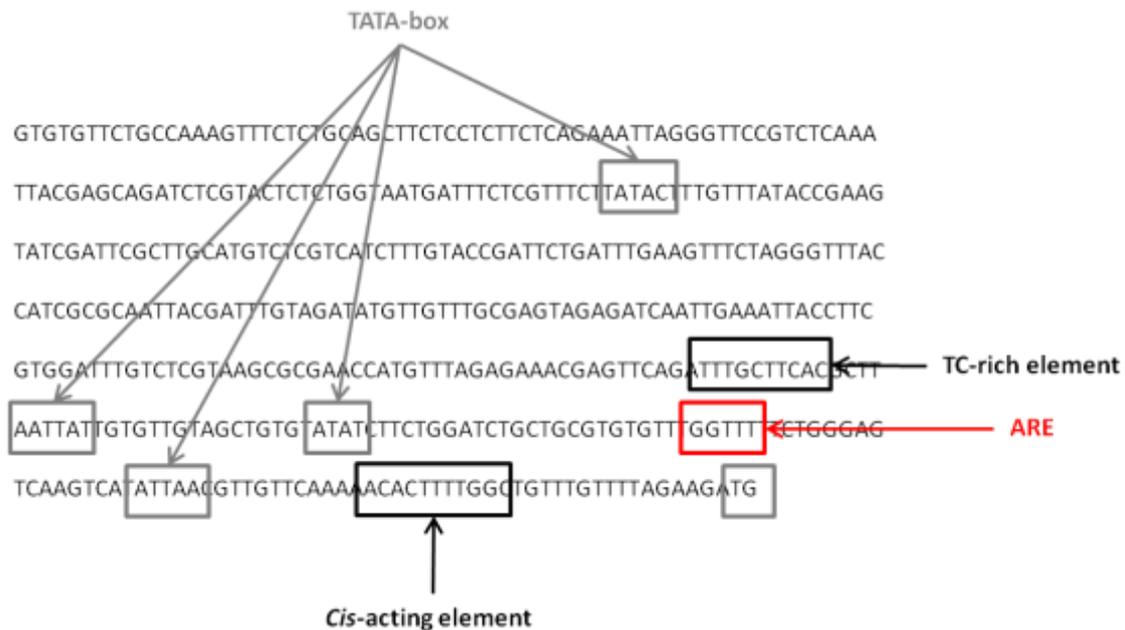
Chapitre 3 : Rôles des canaux potassiques en réponse à l'ozone

Post-transcriptional regulation of the GORK channel by $O_2^{\bullet -}$ participate to outward rectifying K^+ current increase during ozone induced cell death in *A. thaliana* cells

gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide fluorescence. Representative results from three independent experiments are shown. cDNA of *GORK* were collected and sent for sequencing (Eurofins MWG Operon).

Primer sequences:

Gene	Forward	Reverse
AKT2	AAAATGGCGAAAACAC	CGCTGCTTCACATAGAA
SKOR	TGACCCGAATAAGACAG	TGTGTTTCCCATCTG
SLAC1	CCGGGCTCTAGCACTCA	TCAGTGATGCGACTCTT
GORK	CCTCCTTTAATTTAGAAG CCCAGCATCAATCCGCGCCA	GCTCCATCCGATAG CGCGACATGAAGCGGCGTTC
RBP1	ATGCGTCCAAGAGAGTGTTTTGG	TCAATTTCTCCAGCTTCCTCC
EF1α4	ATGCCCCAGGACATCGTGATTTCA	TTGGCGGCACCCTTAGCTGGATCA



Supplementary Figure S1. Distal region of *RBP1* gene (*At3g26420.1*)

Acknowledgements

The authors thank JB Thibaud and B Lacombe (UMR 5004 CNRS-INRA-SupAgro-UM2, Montpellier, France) for fruitful discussions.

References

1. Pell, EJ, Schlagnhauser, CD and Arteca, RN, (1997) Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100: 264-273.
2. Kangasjarvi, J, Talvinen, J, Utriainen, M and Karjalainen, R, (1994) Plant Defense Systems Induced by Ozone. *Plant Cell and Environment* 17: 783-794.
3. Kadono, T, Tran, D, Errakhi, R, Hiramatsu, T, Meimoun, P, Briand, J et al., (2010) Increased anion channel activity is an unavoidable event in ozone-induced programmed cell death. *PLoS One* 5: e13373.
4. Bortner, CD and Cidlowski, JA, (2007) Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: Role in apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462: 176-188.
5. Reape, TJ and McCabe, PF, (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist* 180: 13-26.
6. van Doorn, WG, Beers, EP, Dangl, JL, Franklin-Tong, VE, Gallois, P, Hara-Nishimura, I et al., (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* 18: 1241-6.
7. Yu, SP and Choi, DW, (2000) Ions, cell volume, and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 9360-9362.
8. Peters, J and Chin, CK, (2007) Potassium loss is involved in tobacco cell death induced by palmitoleic acid and ceramide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 465: 180-6.
9. Okada, Y and Maeno, E, (2001) Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130: 377-83.
10. Demidchik, V, Cuin, TA, Svistunenko, D, Smith, SJ, Miller, AJ, Shabala, S et al., (2010) *Arabidopsis* root K^+ -efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science* 123: 1468-1479.
11. Lebaudy, A, Very, AA and Sentenac, H, (2007) K^+ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *Febs Letters* 581: 2357-2366.
12. Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R. 2000. GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a $K(+)$ -selective, $K(+)$ -sensing ion channel. *Febs Letters* 486:93-98.
13. Gaymard, F, Pilot, G, Lacombe, B, Bouchez, D, Bruneau, D, Boucherez, J et al., (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K^+ release into the xylem sap. *Cell* 94: 647-655.
14. Hosy, E, Vavasseur, A, Mouline, K, Dreyer, I, Gaymard, F, Poree, F et al., (2003) The *Arabidopsis* outward K^+ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 5549-5554.
15. Michard, E, Dreyer, I, Lacombe, B, Sentenac, H and Thibaud, JB, (2005) Inward rectification of the AKT2 channel abolished by voltage-dependent phosphorylation. *Plant Journal* 44: 783-97.
16. Shabala, S, Cuin, TA, Prismall, L and Nemchinov, LG, (2007) Expression of animal CED-9 anti-apoptotic gene in tobacco modifies plasma membrane ion fluxes in response to salinity and oxidative stress. *Planta* 227: 189-197.
17. Garcia-Mata, C, Wang, J, Gajdanowicz, P, Gonzalez, W, Hills, A, Donald, N et al., (2010) A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K^+ channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H_2O_2 . *Journal of Biological Chemistry* 285: 29286-94.

18. Gauthier, A, Lamotte, O, Reboutier, D, Bouteau, F, Pugin, A and Wendehenne, D, (2007) Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal Behav* 2: 86-95.
19. Lachaud, C, Da Silva, D, Amelot, N, Beziat, C, Briere, C, Cotelle, V et al., (2011) Dihydrosphingosine-Induced Programmed Cell Death in Tobacco BY-2 Cells Is Independent of H_2O_2 Production. *Molecular Plant* 4: 310-318.
20. McCabe, PF and Leaver, CJ, (2000) Programmed cell death in cell cultures. *Plant Molecular Biology* 44: 359-68.
21. Wendehenne, D, Lamotte, O, Frachisse, JM, Barbier-Brygoo, H and Pugin, A, (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* 14: 1937-51.
22. Kadono, T, Yamaguchi, Y, Furuichi, T, Hirono, M, Garrec, JP and Kawano, T, (2006) Ozone-induced cell death mediated with oxidative and calcium signaling pathways in tobacco bel-w3 and bel-B cell suspension cultures. *Plant Signal Behav* 1: 312-22.
23. El-Maarouf, H, Barny, MA, Rona, JP and Bouteau, F, (2001) Harpin, a hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Febs Letters* 497: 82-84.
24. Reboutier, D, Bianchi, M, Brault, M, Roux, C, Dauphin, A, Rona, JP et al., (2002) The indolic compound hypaphorine produced by ectomycorrhizal fungus interferes with auxin action and evokes early responses in nonhost *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 932-938.
25. Reboutier, D, Frankart, C, Briand, J, Biligui, B, Laroche, S, Rona, JP et al., (2007) The HrpN(ea) harpin from *Erwinia amylovora* triggers differential responses on the nonhost *Arabidopsis thaliana* cells and on the host apple cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 94-100.
26. Jeannette, E, Rona, JP, Bardat, F, Cornel, D, Sotta, B and Miginiac, E, (1999) Induction of RAB18 gene expression and activation of K^+ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Journal* 18: 13-22.
27. Schroeder, DC, (1987) The Analysis of Nitrate in Environmental-Samples by Reversed-Phase Hplc. *Journal of Chromatographic Science* 25: 405-408.
28. Torsethaugen, G, Pell, EJ and Assmann, SM, (1999) Ozone inhibits guard cell K^+ channels implicated in stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13577-13582.
29. Sandermann, H, Ernst, D, Heller, W and Langebartels, C, (1998) Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science* 3: 47-50.
30. Jessica Chen, M, Sepramaniam, S, Armugam, A, Shyan Choy, M, Manikandan, J, Melendez, AJ et al., (2008) Water and ion channels: crucial in the initiation and progression of apoptosis in central nervous system? *Curr Neuropharmacol* 6: 102-16.
31. Becker, D, Hoth, S, Ache, P, Wenkel, S, Roelfsema, MRG, Meyerhoff, O et al., (2003) Regulation of the ABA-sensitive *Arabidopsis* potassium channel gene GORK in response to water stress. *Febs Letters* 554: 119-126.
32. Vahisalu, T, Kollist, H, Wang, YF, Nishimura, N, Chan, WY, Valerio, G et al., (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452: 487-91.
33. Floris, M, Mahgoub, H, Lanet, E, Robaglia, C and Menand, B, (2009) Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *Int J Mol Sci* 10: 3168-85.

34. Puckette, MC, Tang, YH and Mahalingam, R, (2008) Transcriptomic changes induced by acute ozone in resistant and sensitive *Medicago truncatula* accessions. *Bmc Plant Biology* 8: -.
35. Lorkovic, ZJ, (2009) Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends Plant Sci* 14: 229-36.
36. Bus, JS and Gibson, JE, (1984) Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* 55: 37-46.
37. Gadjev, I, Vanderauwera, S, Gechev, TS, Laloi, C, Minkov, IN, Shulaev, V et al., (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141: 436-45.
38. Moldau, H, Vahisalu, T and Kollist, H, (2011) Rapid stomatal closure triggered by a short ozone pulse is followed by reopening to overshooting values. *Plant Signal Behav* 6: 311-3.
39. Apel, K and Hirt, H, (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
40. Wojtaszek, P, Stobiecki, M and Bolwell, GP, (1997) Changes in the composition of exocellular proteins of suspension-cultured *Lupinus albus* cells in response to fungal elicitors or $CuCl_2$. *Journal of Experimental Botany* 48: 2015-2021.
41. Ludwikow, A and Sadowski, J, (2008) Gene networks in plant ozone stress response and tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1256-1267.
42. Mahalingam, R, Jambunathan, N, Gunjan, SK, Faustin, E, Weng, H and Ayoubi, P, (2006) Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* 29: 1357-1371.
43. Schmidt, F, Marnef, A, Cheung, MK, Wilson, I, Hancock, J, Staiger, D et al., (2010) A proteomic analysis of oligo(dT)-bound mRNP containing oxidative stress-induced *Arabidopsis thaliana* RNA-binding proteins ATGRP7 and ATGRP8. *Molecular Biology Reports* 37: 839-45.
44. Szyroki, A, Ivashikina, N, Dietrich, P, Roelfsema, MR, Ache, P, Reintanz, B et al., (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2917-21.
45. Negi, J, Matsuda, O, Nagasawa, T, Oba, Y, Takahashi, H, Kawai-Yamada, M et al., (2008) CO_2 regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483-U13.

Chapitre 4

Implication des activités de type caspase

Introduction

Suite à une forte exposition à l’ozone, l’efflux d’anions et de potassium au travers de canaux ioniques entraîne très probablement un efflux massif d’eau conduisant à une plasmolyse des cellules d’*Arabidopsis* participant à la PCD (cf. Chapitres 2,3). Dans les modèles animaux, la diminution de la concentration de K^+ intracellulaire suite à l’activation de canaux potassique sortants permettrait l’activation de certaines enzymes, notamment de caspases et de nucléases orchestrant l’apoptose (Yu & Choi, 2000; Bortner & Cidlowski, 2007). Les gènes homologues de ceux codant les caspases chez les animaux n’existent pas chez les plantes. Cependant, une famille de protéines, les métacaspases, a été identifiées chez les plantes (Coll et al., 2011). De façon similaire, ces métacaspases contiennent un site catalytique histidine-cystéine conservé, mais les métacaspases sont des cystéine-protéases clivant leurs substrats après une arginine ou une lysine différant ainsi des caspases clivant leur substrat après un résidu aspartate (Coll et al., 2011). Chez *Arabidopsis*, il existe neuf gènes codant des métacaspases (Tsiatsiani et al., 2011). Ces métacaspases semblent être impliquées dans le processus de HR, et lors de processus de PCD induits par des stress oxydants ou la toxine fongique fumonisin B-1 (Tsiatsiani et al., 2011). Parmi les gènes codant des métacaspases, le gène *AtMC8* est surexprimé en réponse à un stress oxydatif et sa surexpression nécessite le gène « *Radical Induced Cell Death1* » (Tsiatsiani et al., 2011), qui est aussi un médiateur de la réponse au stress O_3 chez *Arabidopsis* (Overmyer et al., 2005). Malgré l’absence d’homologues proches des caspases chez les plantes, différentes études ont montrés que les inhibiteurs spécifiques des activités de type caspase animales sont efficaces chez les plantes et peuvent notamment réduire les symptômes de HR (Coll et al., 2011). Parmi les activités de type caspase repérées chez les plantes, les « *Vacuolar Processing Enzymes* » (VPE) présentent potentiellement une activité de type caspase-1 lors de la HR et en réponse à des toxines fongiques formant des lésions sur les feuilles d’*Arabidopsis* et induisant le collapse de la membrane vacuolaire (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). Ces VPEs servent à convertir de nombreux précurseurs protéiques en leurs formes matures dans la vacuole, notamment des enzymes hydrolytiques comme des cystéine-protéinases ou des nucléases nécessaires à la dégradation des composants cellulaires lors de la PCD (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011).

Contrairement aux cellules animales, les cellules végétales possèdent, en générale, de grandes vacuoles pouvant être impliquées lors de la PCD de deux différentes façons : destructive ou non destructive (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). La voie impliquant la destruction se manifeste par le collapse de la membrane vacuolaire suivi d’une libération d’enzymes hydrolytiques dans le cytosol, induisant une mort cellulaire rapide. Ce type de mort est observé en réponse à des toxines fongiques, des infections virales ou dans les formes de PCD développementale. La seconde voie, non destructive, implique la fusion des membranes vacuolaire et plasmique permettant la libération de protéines de défense dans l’apoplasme contre des bactéries. Ces deux voies impliquent des enzymes ayant des activités de type caspase ; la voie non destructive impliquant une sous unité du protéasome, PBA1, ayant une activité de type caspase-3, le collapse vacuolaire impliquant une VPE

présentant une activité de type caspase-1 (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). Bien que les VPEs ne soient reliées ni à la famille des caspases ni des métacaspases, les VPEs et les caspases-1 présentent des propriétés enzymatiques communes en terme de site actif et de substrats (activité « YVADase »). De plus, les VPEs et les caspase-1 sont susceptibles d'activation autocatalytique à partir de leurs précurseurs inactifs. Leur différence fondamentale est leur localisation ; vacuolaire pour les VPEs et cytosolique pour les caspases-1. Quoi qu'il en soit, la conservation au travers des règnes des activités de type caspase dans la régulation de la PCD met en exergue leur rôle fondamental dans la machinerie cellulaire amenant à la PCD, même si des voies dépendantes ou indépendantes de ces activités peuvent coexister (Coll et al., 2011; Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011; Tsiatsiani et al., 2011).

Chez les plantes, à notre connaissance, la perte de K^+ intracellulaire et la stimulation d'activités de type caspase n'ont pu être observées jusqu'à maintenant que chez le tabac en réponse à des céramides induisant une PCD lors de deux études indépendantes (Peters & Chin, 2007; Lachaud et al., 2010). En réponse à l'ozone, des activités protéases de type caspase ont été détectées chez *Arabidopsis* (Overmyer et al., 2005) et nous avons pu montrer sur notre modèle (Chapitre 2) l'augmentation des transcrits codant la *VPE γ* , VPE impliquée lors de processus de PCD chez les plantes en réponse à des agents pathogènes (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). Nous avons donc cherché si des activités de type caspase pouvaient être détectées dans les cellules d'*A. thaliana* en réponse à l' O_3 , en utilisant l'inhibiteur général de caspase zVAD-fluorométhylketone (z-VAD-fmk) couplé à une sonde FITC (Tsiatsiani et al., 2011). Nous avons également recherché si ces activités de type caspase étaient dépendantes des événements précoces induits par l' O_3 dans les cellules d'*A. thaliana* (Chapitre 2 et 3) et, d'une variation de la teneur en K^+ intracellulaire comme cela a pu être démontré chez les cellules animales (Yu & Choi, 2000; Bortner & Cidlowski, 2007) et suggéré sur les cellules végétales (Peters & Chin, 2007).

Matériels & Méthodes

Cultures cellulaires

Pour ce travail nous avons utilisé la même lignée d'*Arabidopsis thaliana* (écotype *Columbia*) cultivée et repiquée tel que décrit dans les précédents chapitres (cf. p 79).

Observation au microscope confocal

Les activités de type caspase ont été détectées par fluorescence en utilisant la sonde FITC-VAD-fmk ($\lambda_{Exc}= 490$ nm, $\lambda_{Em}= 528$ nm) conformément aux instructions du fabricant (G7461, CaspACE™ FITC-VAD-FMK, Promega). Les teneurs en K^+ intracellulaires ont été détectées à l'aide la sonde fluorescente PBFI-AM ($\lambda_{Exc}= 340$ nm, $\lambda_{Em}= 500$ nm), conformément aux instructions du fabricant (P-1267MP, PBFI-AM *cell permeant*, Invitrogen). Les cellules ont été traitées par un pulse de 10 minutes d' O_3 , puis incubées avec 10 μ M FITC-VAD-fmk et 10 μ M PBFI-AM pendant 15 min avant l'observation aux temps indiqués (0', 30', 60' ou 120'). Les différents agents pharmacologiques

utilisés ont été adjoints à la culture cellulaires 15 minutes avant le pulse d'O₃ et les observations sont faites dans les 120 minutes suivantes. Ces observations ont été réalisées avec un microscope confocal à balayage laser LSM (Leica, Allemagne) en conservant les mêmes paramètres (pinhole, gain, offset, illumination, intensité) permettant une comparaison des intensités.

Ces expériences ont été menées au Laboratoire Internationale de Neurobiologie Végétale (LINV) dirigé par le Pr Stefano Mancuso à l'Université de Firenze (Italie) avec l'aide de Marika Rossi.

Quantification de la fluorescence

Les quantifications de la fluorescence ont été effectuées sur des cellules représentatives des différents traitements ($n \geq 10$) à l'aide du logiciel Image J. Les intensités sont exprimées en moyenne d'Unités Relative de Fluorescence par μm^2 (URF. μm^2).

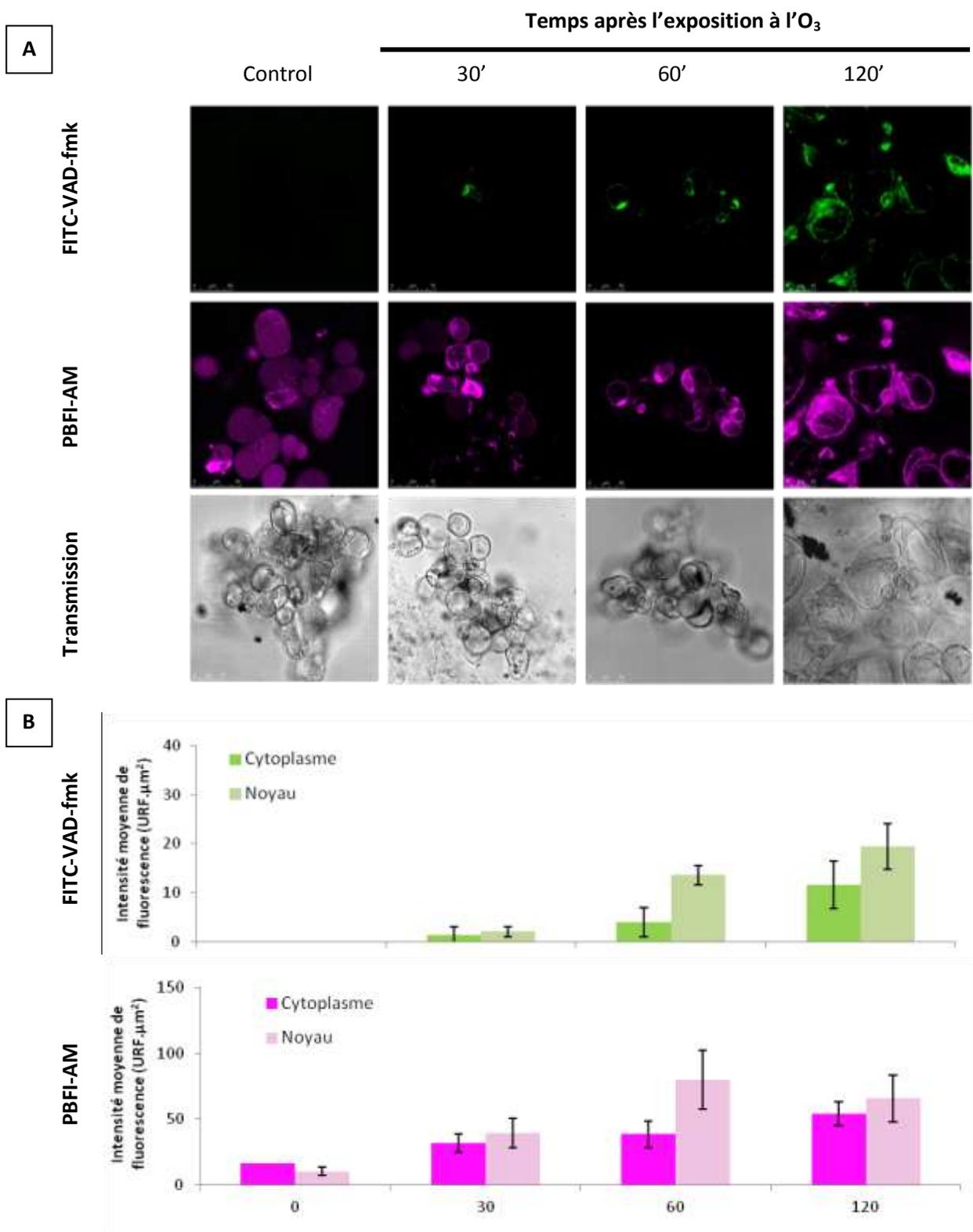


Figure 33. Détection des concentrations intracellulaires de K⁺ et des activités de type caspase après un pulse d'O₃ sur des cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*.

A. Cellules traitées avec un pulse de 10 min d'O₃ suivi par fluorescence après 30', 1h et 2h avec les sondes PBFI-AM et FITC-VAD-fmk. B. Quantification de la fluorescence relative au niveau de la vacuole et du cytoplasme.

Résultats préliminaires

Les activités de type caspase sont activées en réponse à l'ozone

Le traitement à l'ozone appliqué aux cellules d'*Arabidopsis* entraîne une PCD atteignant son maximum d'intensité au bout de 2 heures (Chapitre 2). Comme le montre la Figure 33A, on n'observe aucune fluorescence de la sonde FITC-VAD-fmk en situation control (bullage d'air 10 min) alors que la fluorescence de la sonde indiquant des activités de type caspase augmente progressivement après un traitement de 10' à l'O₃. A 2 h, cette fluorescence est principalement localisée au niveau du cytoplasme et du noyau (Figure 33A). L'intensité moyenne de la fluorescence croît au cours des 120 minutes suivant le traitement O₃, atteignant 12 ± 4 URF. μm^{-2} au niveau du cytoplasme et 19 ± 5 URF. μm^{-2} dans le noyau (Figure 33B). Le co-marquage des mêmes cellules avec la sonde PBFI, montre une localisation diffuse assez homogène la teneur en K⁺ intracellulaire en condition control (Figure 33B). Il important de noter que l'efficacité de la sonde n'est optimale qu'à pH=7, et que la quantification au niveau vacuolaire (pH=5-5,5) n'est donc pas optimale. Quoi qu'il en soit, après un pulse de 10' d'O₃, la teneur en K⁺ intracellulaire n'est plus homogène, la fluorescence augmentant dans le cytoplasme et semblant réduire au niveau de la zone vacuolaire. La quantification de la fluorescence montre une augmentation progressive, au niveau du cytoplasme et du noyau, au cours des 2h suivant le traitement O₃ (Figure 33A et B). Les augmentations de fluorescence concernant la stimulation des activités de type caspase et l'augmentation du K⁺ cytosolique sont donc corrélées dans l'espace mais aussi dans le temps suggérant que ces deux évènements pourraient être liés.

Ainsi, après un pulse d'O₃, la concentration des ions K⁺ au niveau du cytoplasme ($[\text{K}^+]_{\text{cyt}}$) et au niveau nucléaire ($[\text{K}^+]_{\text{nuc}}$) est augmentée (x 3) après deux heures comparé au cellules traitées à l'air, alors que $[\text{K}^+]_{\text{vac}}$ semble diminuer (Figure 33B). On peut donc supposer que cette augmentation de $[\text{K}^+]_{\text{cyt}}$ correspond à une sortie d'ions K⁺ de la vacuole vers le cytoplasme au cours du temps ou à une entrée de K⁺ dans la cellule car aucune activité des canaux K⁺ de type IRC n'a été détectée après un pulse d'O₃ (Chapitre 2 et 3). Chez *A. thaliana*, la concentration des ions K⁺ est plus importante dans la vacuole ($[\text{K}^+]_{\text{vac}} = 50$ à 300mM) par rapport à celle du cytosol qui est de l'ordre de 25-100 mM (Britto & Kronzucker, 2008; Karley & White, 2009) rendant possible une sortie d'ions K⁺ de la vacuole vers le cytoplasme. L'ensemble des données laisse suggérer que la/les voie(s) de signalisation activant les enzymes possédant une activité de type caspase est plus complexe chez *Arabidopsis* lors d'un fort stress à l'O₃, comparée au modèle décrit chez les modèles animaux (Yu & Choi, 2000). L'activation des enzymes ayant une activité de type caspase pourrait être liée, ici, à la diminution de $[\text{K}^+]_{\text{vac}}$ et/ou à l'augmentation de $[\text{K}^+]_{\text{cyt}}$, voire du $[\text{K}^+]_{\text{nuc}}$.

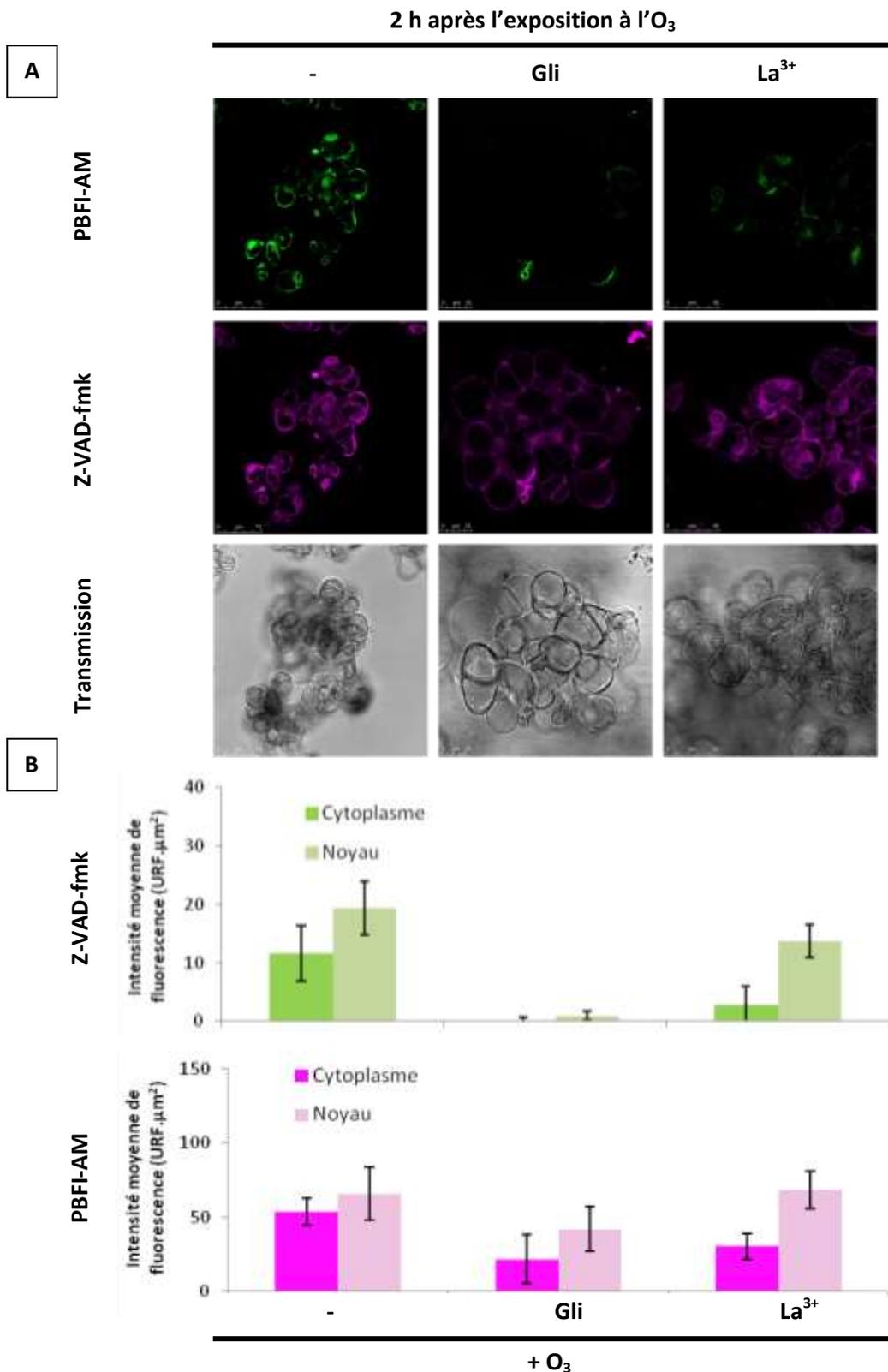


Figure 34. Détection des variations intracellulaires de K⁺ et des activités de type caspase après un pulse d'O₃ sur des cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*.

A. Suivi de fluorescence 2h après un traitement de 10 minutes d'O₃ à l'aide des sondes PBFI-AM et z-VAD-fmk. Les cellules sont un pré-traitées soit avec du glibenclamide (200 µM) ou du La³⁺ (500µM). B. Quantification de la fluorescence relative au niveau de la vacuole et du cytoplasme 2 h après un pulse de 10 minutes d'O₃ et un pré-traitement avec du glibenclamide (200 µM) ou du La³⁺ (500µM).

Implication des évènements précoces induit par l'O₃ dans la stimulation des activités de type caspase

Dans les chapitres précédents, nous avons montré qu'une boucle d'interaction incluant les canaux anioniques, les variations de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et les ROS, intervient précocement dans les voies de signalisation induite par l'O₃ et menant à la PCD. Nous avons donc vérifié si ces différents évènements étaient impliqués dans l'activation des activités de type caspase. Une approche pharmacologique a été entreprise avec des inhibiteurs spécifiques des canaux anioniques et calciques efficaces sur notre modèle : le glibenclamide et le lanthane (La³⁺), respectivement. Ces inhibiteurs sont capables de contrer la PCD induite par l'O₃ et de réduire la dépolarisation de la membrane plasmique (Chapitre 2). La Figure 34 montre que le prétraitement des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis* avec le glibenclamide, réduit de manière sévère la stimulation des activités de type caspase, deux heures après le pulse de 10' à l'O₃ au niveau du cytoplasme et du noyau. Le prétraitement au La³⁺ est plus efficace pour réduire ces activités au niveau du cytoplasme qu'au niveau nucléaire (Figure 34B). Ces deux inhibiteurs limitent également l'augmentation de $[K^+]_{cyt}$ comparé aux cellules traitées à l'O₃ seul. Cette diminution passe de 54 ± 9 URF. μm^2 en traitement à l'O₃ seul, à 22 ± 17 et 30 ± 9 URF. μm^2 pour les cellules prétraitées avec le glibenclamide et le lanthane, respectivement au niveau du cytoplasme (Figure 34B). Au niveau nucléaire, le La³⁺ ne modifie pas $[K^+]_{nuc}$ tandis que le glibenclamide le réduit de moitié. Les canaux anioniques et calciques pourraient participer aux voies de signalisation permettant l'activation des enzymes de type caspase et *in fine* à la PCD induite par l'O₃.

Le troisième évènement intervenant dans la boucle d'interaction en réponse à l'ozone, est la génération de ROS (Chapitre 2) qui pourrait réguler l'activité des canaux potassiques (Chapitre 3). Nous avons donc vérifié si ces ROS avaient une incidence sur la régulation des activités de type caspase et la variation de K⁺ intracellulaire. Les cellules ont donc été prétraitées avec du Tiron, du Dabco et du DPI (pièges à O₂^{•-}, ¹O₂ et inhibiteur de NADPH oxydase, respectivement) avant un traitement de 10' à l'O₃. On observe qu'un prétraitement au DPI inhibe l'effet du traitement à l'O₃ que ce soit au niveau de la distribution des ions K⁺ et au niveau des activités de type caspase deux heures après le traitement (Figure 35A et B). De même, le Dabco et le Tiron réduisent également les activités de type caspase tandis que les $[K^+]_{nuc}$ et $[K^+]_{cyt}$ sont sévèrement diminuées comparé aux cellules exposées à l'O₃ seule. La stimulation des activités de type caspase semble donc particulièrement sensible aux ROS produit par l'O₃ et au stress oxydant qui en résulte. La boucle d'interaction mise en évidence en réponse à l'O₃ (Chapitre 2) semble être un processus se déclenchant en amont de l'augmentation des activités de type caspase. Ces données sont cohérentes avec la diminution de la transcription de la *VPEy* par cette même pharmacologie (Chapitre 2). Les ROS semblent également réguler les variations de K⁺ intracellulaire confirmant ces variations de concentrations potassiques ($[K^+]_{cyt}$ et/ou $[K^+]_{vac}$) pourraient participer aux voies de signalisation permettant la stimulation des activités de type caspase.

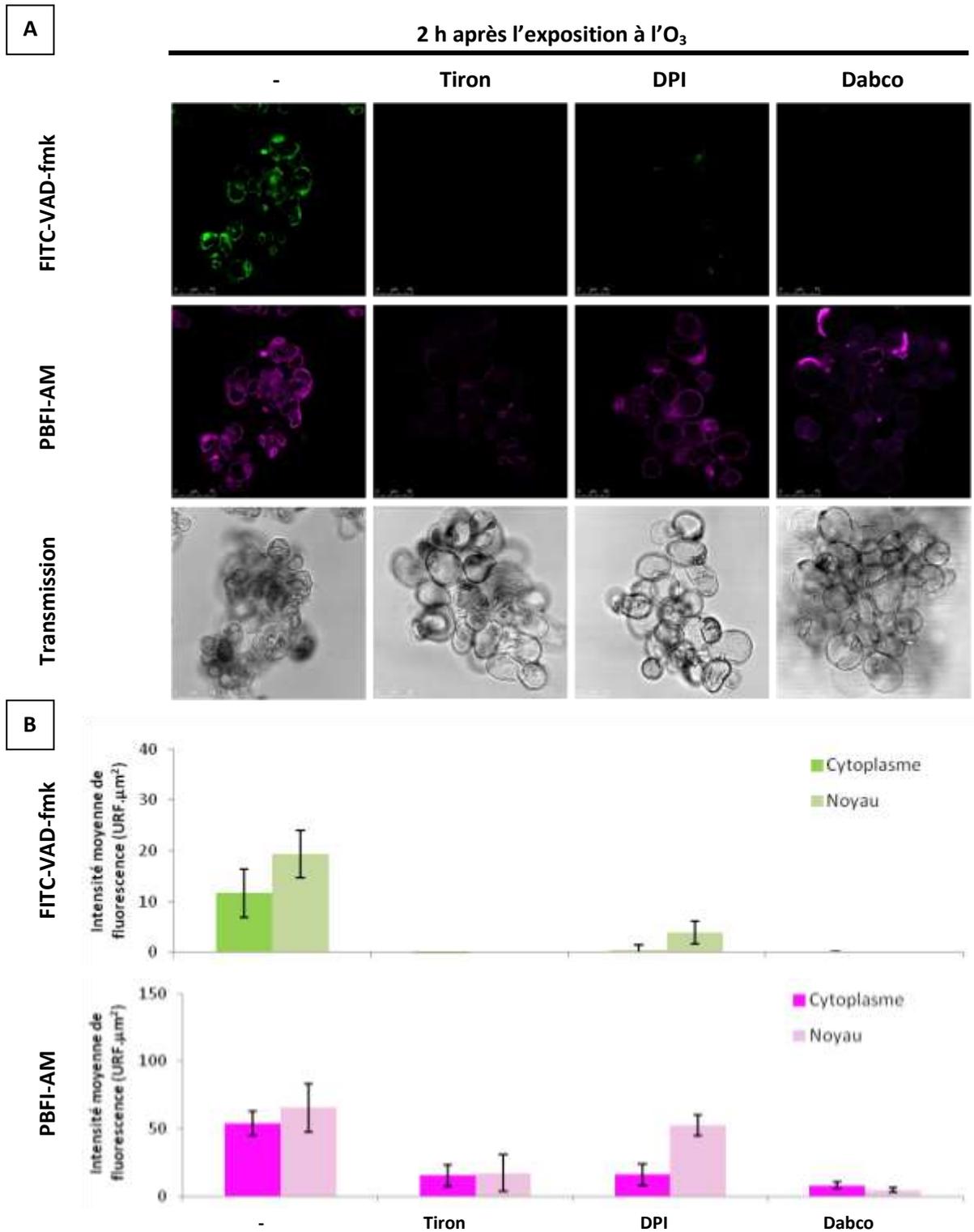


Figure 35. Détection des variations intracellulaires de K⁺ et des activités de type caspase après un pulse d'O₃ sur des cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*.

A. Suivi de fluorescence 2h après un traitement de 10 minutes d'O₃ à l'aide des sondes PBFI-AM et FITC-VAD-fmk. Les cellules sont un pré-traitées soit avec du Tiron (5mM), du DPI (10 μM) ou du Dabco (5mM). B. Quantification de la fluorescence relative au niveau de la vacuole et du cytoplasme 2h après un pulse de 10 minutes d'O₃ avec les différents traitements pharmacologiques.

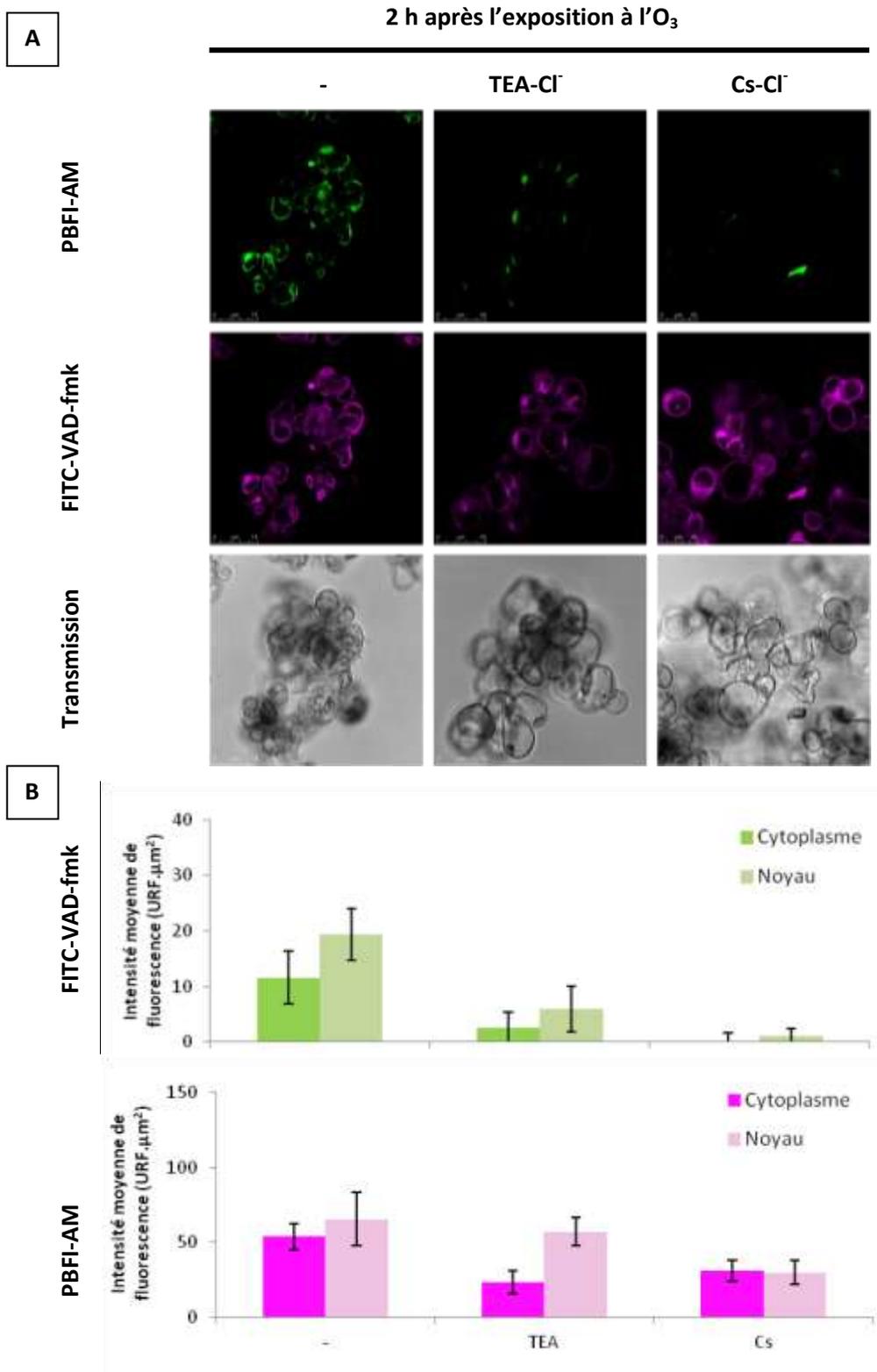
Implication des canaux K^+

Afin de vérifier si l'activation des canaux KORC (Chapitre 3) est liée à l'activation des activités de type caspase après un traitement à l' O_3 , nous avons prétraités des cellules en culture par des inhibiteurs de canaux potassiques de la membrane plasmique. Un prétraitement par le TEA diminue les activités enzymatiques de type caspase (4 fois inférieur) après un pulse d' O_3 (Figure 36B). Le Césium (Cs) inhibe ces activités de type caspase quasi totalement (Figure 36A et B).

Au niveau de la distribution des ions K^+ , la fluorescence est moins intense au niveau du cytoplasme après le prétraitement par les deux inhibiteurs (Figure 36A). Au niveau nucléaire, le Cs est plus efficace que le TEA pour limiter l'augmentation de $[K^+]$ intracellulaire après le pulse d' O_3 (Figure 36). Les cellules prétraitées avec le TEA et le Cs ont une intensité respective de 23 ± 8 et 31 ± 7 URF. μm^{-2} comparée aux cellules non prétraitée avant le pulse d' O_3 (54 ± 9 URF. μm^{-2}) au niveau du cytoplasme.

Conclusion

Dans ce travail préliminaire, nous avons pu montrer chez les cellules en culture d'*A. thaliana*, une stimulation des activités de type caspase en réponse à l'ozone, ces activités s'amplifiant au cours des 2 heures suivant le traitement. Ces résultats confirment ceux obtenus par Overmyer et al. (2005) sur feuilles d'*Arabidopsis*. Des résultats similaires ont aussi été obtenus sur des cellules de tabac traitées par différents inducteurs de PCD, la staurosporine, la cycloheximide ou la sphinganine (Elbaz et al., 2002; Lachaud et al., 2010). La sonde FITC-VAD-fmk étant un inhibiteur général de caspases, il ne permet pas de différencier parmi les différentes activités potentiellement induites lors de la PCD provoquée par l' O_3 . Il conviendra de tester des inhibiteurs spécifiques pour discriminer parmi ces différentes activités. Il est toutefois notable que des activités ont pu être repérées au niveau cytosolique et nucléaire suggérant la possible implication de plusieurs types d'activités caspases. Nous pouvons aussi noter que la pharmacologie efficace pour réduire la transcription de la *VPEy* (glibenclamide et DPI, chapitre 2) s'est avérée aussi efficace pour réduire les activités mise en évidence par le FITC-VAD-fmk (Figure 34 et 35). Les VPEs étant responsables d'activités caspase-1 et, impliquées dans les formes de PCD présentant un collapse vacuolaire (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011) comme nous avons pu l'observer en réponse à l' O_3 , il sera donc particulièrement intéressant de rechercher si des activités de type caspase-1 sont impliqués dans notre système.



L'utilisation de divers agents pharmacologiques nous a permis de montrer que les évènements précoces (augmentation de l'activité des canaux anioniques, variation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et génération de ROS) mis en évidence en réponse à l' O_3 dans nos cellules (chapitre 2), sont des évènements se situant en amont de la voie de signalisation amenant à l'augmentation des activités de type caspase, puisque tous ces agents ; inhibiteurs de canaux anioniques (glibenclamide) ou calciques (lanthane), inhibiteur de la NADPH-oxydase (DPI) ou pièges à $O_2^{\cdot -}$ (Tiron) ou du 1O_2 (DABCO) se sont tous révélés efficaces pour réduire ces activités de type caspase. L'impact quasi similaire de ces différents agents pharmacologiques renforce ainsi l'hypothèse des interactions entre ces différents évènements comme suggérés dans le chapitre 2.

L'apparition des activités de type caspase 30' après le traitement O_3 puis leur augmentation jusqu'à 2 heures, se corrèle à la cinétique d'activation des courants KORC enregistrée sur nos cellules en réponse au même traitement (Chapitre 3). Les bloqueurs de canaux K^+ se sont aussi révélés efficaces pour inhiber les activités de type caspase. Cependant, contrairement à ce qui aurait été attendu d'après ces données et ce qui a pu être décrit dans les modèles animaux lors de l'AVD (Bortner & Cidlowski, 2007), à savoir une diminution de la teneur en K^+ cytosolique lors de la progression de la PCD. Nous avons observés, pendant le même laps de temps et sur les mêmes cellules, une augmentation de la fluorescence émise par le PBFI au niveau cytoplasmique et nucléaire, indiquant une augmentation du $[K^+]_{cyt}$ et $[K^+]_{nuc}$ concomitante à l'augmentation des activités de type caspase. Ainsi, après un pulse d' O_3 , le $[K^+]_{cyt}$ est augmentée de 3 fois en deux heures comparé au $[K^+]_{cyt}$ de cellules traitées à l'air. L'hypothèse d'une entrée de K^+ dans la cellule est envisageable dans la mesure où les inhibiteurs de canaux K^+ (TEA et Cs^+) semblent aussi diminuer le $[K^+]_{cyt}$ et sont aussi efficaces sur les canaux K^+ entrants. Cependant, aucune activité des canaux K^+ de type IRC n'a été détectée après un pulse d' O_3 (Chapitre 2 et 3), et ces inhibiteurs pourraient aussi être efficaces sur des canaux permettant la libération du K^+ de la vacuole vers le cytoplasme, comme par exemple le canal vacuolaire SV sélectif au K^+ (Weiser & Bentrup, 1993). La zone vacuolaire présentant une fluorescence moins forte après le traitement O_3 , on peut aussi raisonnablement supposer que cette augmentation de $[K^+]_{cyt}$ correspond à une sortie d'ions K^+ de la vacuole vers le cytoplasme au cours du temps même si les conditions de pH vacuolaire ne sont pas optimales pour la détection par cette sonde. Chez *A. thaliana*, la concentration des ions K^+ peut être plus importante dans la vacuole ($[K^+]_{vac} = 50$ à 300 mM) par rapport à celle du cytosol qui est de l'ordre de 25 - 100 mM (Britto & Kronzucker, 2008; Karley & White, 2009). Une forte augmentation de l'intensité de fluorescence au niveau du cytoplasme pourrait résulter d'un efflux de K^+ de la vacuole même si celle-ci ne présente pas une forte intensité de fluorescence. On ne peut donc exclure que dans notre système, l'augmentation de $[K^+]_{cyt}$ ne soit pas concomitante d'une forte diminution de K^+ vacuolaire et d'une perte globale du K^+ cellulaire compatible avec l'activation des canaux K^+ sortants. Il conviendra donc de quantifier les éventuels efflux de K^+ de la vacuole et de la cellule en réponse à l' O_3 pour pouvoir répondre à cette question. Avec les données que nous possédons, nous ne pouvons donc pas affirmer que ces résultats s'opposent totalement à ce qui a pu être observée lors de la PCD induites par des céramides sur cellules de tabac (Peters & Chin, 2007).

Des données complémentaires sont nécessaires pour expliquer ces résultats en apparentes contradictions avec ceux décrits dans les modèles animaux (Yu & Choi, 2000; Bortner & Cidlowski, 2007) et chez le tabac (Peters & Chin, 2007). On peut cependant émettre l'hypothèse que la diminution du K^+ vacuolaire pourrait permettre l'activation d'enzymes présentant des activités de type caspase, à l'instar de ce qui se passe lors de l'abaissement de la teneur en K^+ cytosolique permettant l'activation de caspases dans les cellules animales. Les VPEs, dont la transcription est augmentée par l' O_3 , sont des enzymes vacuolaires susceptibles, comme les caspases-1, d'activation autocatalytique à partir de leurs précurseurs inactifs et elles participent également à la maturation de diverses protéases et nucléases (Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). Il sera donc intéressant de vérifier si l'activité de la VPE γ en particulier, est sensible à la teneur en K^+ ou tout au moins à la force ionique. Cette hypothèse imposera de vérifier également si cette VPE γ et/ou d'autres enzymes susceptibles d'avoir des activités de type caspase peuvent être maturées dans la vacuole et exportées vers le cytoplasme et/ou le noyau.

A notre connaissance, aucune donnée n'existe concernant l'augmentation du $[K^+]_{nuc}$ suite à un traitement à l' O_3 ou même lors des processus de PCD. L'éventuel impact de cette variation sur le fonctionnement nucléaire demandera de futures études mais à l'instar des variations de $[Ca^{2+}]_{nuc}$ mis en évidence lors de la PCD induite par le sphingosine chez le tabac (Lachaud et al., 2010), les variations de $[K^+]_{nuc}$ pourraient participer au processus de PCD. Il a effectivement été montré que l'homéostasie du $[K^+]_{nuc}$ pouvait participer à la régulation de la transcription (Wang et al., 2007).

Chapitre 5

Conclusions & Perspectives

Le travail que j'ai mené lors de cette thèse a permis d'apporter des informations nouvelles concernant le rôle des canaux ioniques de la membrane plasmique dans la réponse à l'ozone chez les plantes. Il souligne l'existence de régulations multiples entre les canaux ioniques et les différents événements de signalisation et confirme l'importance et la complexité de la régulation des canaux anioniques et potassiques ; et ce dans les processus de signalisation et la mécanistique menant à la mort cellulaire programmée chez les cellules en culture d'*A. thaliana*. Basé sur le fait que les différents types de PCD décrits chez les plantes impliquent des processus de plasmolyse, à l'instar du modèle d'AVD décrit en animal, l'hypothèse de travail était de rechercher d'éventuelles similarités et/ou parallèles chez les plantes concernant la régulation des canaux ioniques de la membrane plasmique.

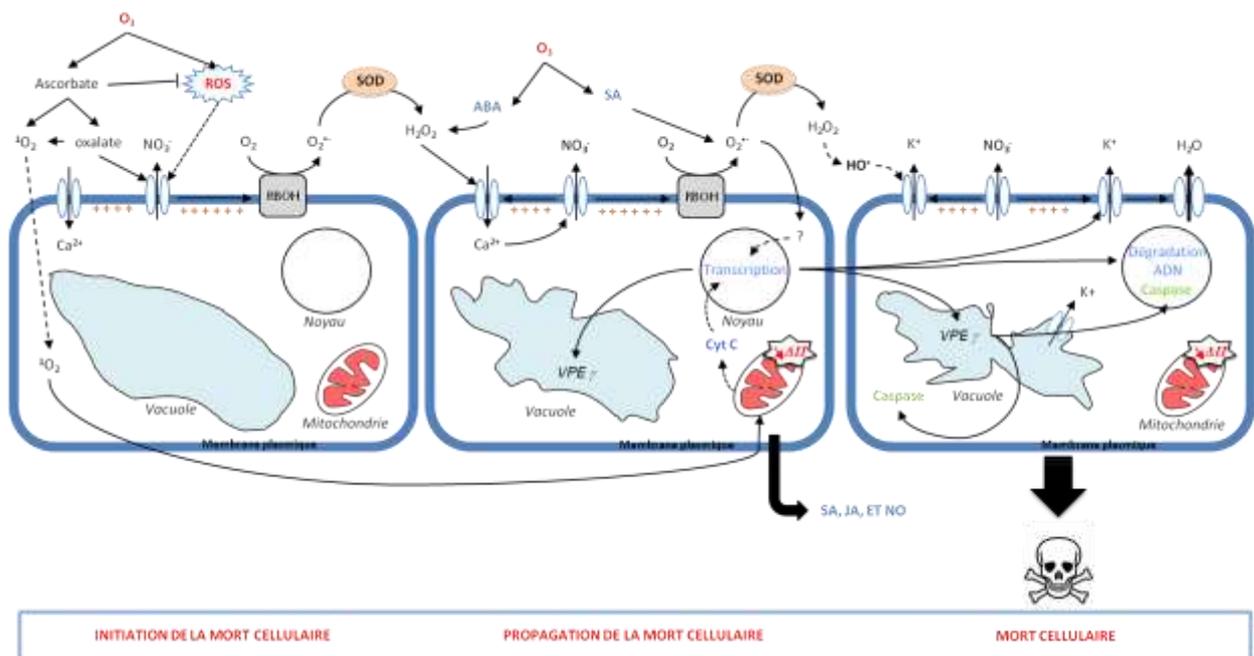


Figure 37. Schéma simplifié des événements de signalisation en réponse à l'Ozone.

En utilisant le modèle des cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana* et la technique du voltage-clamp, nous avons pu suivre la régulation des canaux potassiques et anioniques lors de l'initiation et le déroulement de la PCD. Mes résultats ont mis en évidence, comme le résume la Figure 37, que lors d'une forte exposition à l'ozone, les canaux anioniques sont activés de manière très précoce permettant un efflux soutenu d'anion. Cette activation peut, entre autre, être induite par la dégradation de l' O_3 en ROS d'une part, et par des produits secondaires issus des réactions de l' O_3 avec les molécules présentes dans l'apoplaste, d'autre part. Parmi ces produits secondaires, nous avons démontré que l'acide oxalique résultant probablement de la réaction de l' O_3 avec le pool d'ascorbate pourrait participer à l'activation des canaux anioniques. La production d'oxygène singulet, potentiellement à partir de l'ascorbate (Kanofsky & Sima, 1991), activerait une voie faisant intervenir la mitochondrie. Les efflux d'anions sont indispensables à la mise en place et au déroulement de la mort cellulaire. Il est entretenu par une boucle 'auto-amplifiée' faisant intervenir

la NADPH oxydase, la SOD, un influx calcique et les canaux anioniques. Nous avons également montré que ces différents évènements sont en amont d'une voie de signalisation conduisant à la transcription de gènes nécessaires au processus de PCD, notamment des gènes codant les canaux K^+ GORK et les $VPE\gamma$. Le stress oxydatif et plus particulièrement l' $O_2^{\bullet-}$ pourrait également réguler de manière post-transcriptionnelle les canaux K^+ sortants GORK, permettant une activation plus tardive de ces derniers. Par conséquent, un efflux d'ions K^+ vers l'extérieur a lieu, provoquant certainement avec les efflux soutenus d'anions, la plasmolyse des cellules. Cet évènement s'accompagne par une sortie massive d'eau si l'activation des canaux anioniques est maintenue au cours du temps. En parallèle, la transcription des $VPE\gamma$ pourrait entraîner la stimulation d'activités de type caspase-1 et d'autres types de caspases au niveau nucléaire et cytoplasmique. Toutefois, il est intéressant de noter que le mécanisme d'activation des caspases semble être différent de celui classiquement décrit dans le modèle animal, impliquant chez les plantes une augmentation et non une diminution de la teneur en K^+ cytosolique. L'ADN est alors dégradé et la plasmolyse de la cellule intervient provoquant la mort de la cellule. Cette succession d'évènements au cours de la mise en place de la PCD est représentée sur la Figure 38.

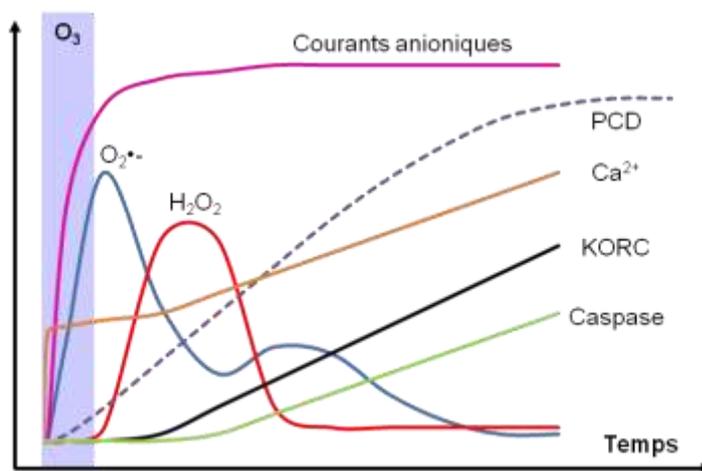


Figure 38. Les variations temporelles des évènements de signalisation induites par l'ozone.

Les modifications relatives des différents évènements de signalisation sont indiquées lors d'une exposition à un fort pulse d' O_3 sur les cellules en suspension d'*A. thaliana*.

La mort cellulaire provoquée par l' O_3 ressemble à la HR induite lors des interactions incompatibles (Kangasjarvi et al., 1994). Récemment, il a été proposé une nouvelle classification concernant les types de PCD rencontrés chez les végétaux (van Doorn et al., 2011). Cette classification basée sur des critères morphologiques définit deux types de morts : une mort dépendante de la vacuole et une mort de type nécrotique. La mort cellulaire vacuolaire participerait à la formation des tissus végétaux et des organes mais aussi à leur élimination lors d'interaction avec des bactéries. La nécrose, quant à elle, est généralement observée en réponse à des stress abiotiques lors de la HR et lors de mort cellulaire induite par des agents pathogènes nécrotrophes (van Doorn et al., 2011). Selon ces critères, la mort induite par l' O_3 serait donc une mort de type

nécrotique. Parmi les caractéristiques communes à la nécrose, on observe effectivement une accumulation de ROS et de RNS ainsi qu'une plasmolyse des cellules comme nous avons pu observer sur les cultures cellulaires d'*A. thaliana* traitées à l'O₃ (chapitres 2 et 3). Toutefois, la mise en évidence d'activités de type caspase et l'augmentation des transcrits codant la VPE γ suggère aussi une dépendance vis-à-vis de la vacuole (Chapitre 2 et 4). La PCD induite par l'ozone présente donc des caractéristiques communes aux deux types de mort cellulaire proposés par van Doorn et ses collaborateurs (2011). On peut se poser la question de savoir s'il s'agit d'une forme de PCD différente de celles déjà décrites ou bien s'il s'agit des deux types de PCD décrites pouvant être induites par un même stress. Ceci renvoie au fait que les nomenclatures permettant la définition de différentes formes de PCD continue à évoluer de nos jours que cela soit dans le domaine animal ou végétal (Bozhkov & Lam, 2011). Si la PCD est un processus bien reconnu de par son rôle fondamental dans la vie des organismes, elle reste difficile à définir de par les divers processus et voies de signalisation qu'elle peut impliquer, et de nombreuses études restent à mener.

En termes de perspectives, une approche sur les lignées mutantes disponibles pour les différents canaux ioniques permettrait de confirmer la nature exacte des canaux impliqués dans la réponse à l'O₃. Plusieurs tentatives d'obtention et de stabilisation ont été réalisées au laboratoire sur différentes lignées mutantes (*slac1*, *gork* et *skor*) mais ce sont avérées infructueuses. Une approche VIGS (=Virus-Induced Gene Silencing) pourrait être envisagée sur culture cellulaires afin de contourner ce problème. Il convient de noter que l'approche sur plantes mutantes est également difficile à mettre en œuvre et à analyser, car les canaux impliqués dans la signalisation menant à la PCD, le sont également dans la fermeture des stomates par lesquels l'O₃ pénètre dans la feuille. Ainsi, des expériences menées sur des plantules de différentes lignées mutantes (*Gork*, *Slac*) traitées à l'O₃ n'ont montré aucune différence significative dans le développement de nécroses foliaires. Des études complémentaires pourraient également être effectuées afin de mieux comprendre la régulation post-transcriptionnelle du gène *GORK* notamment avec des partenaires putatifs de liaison impliquée dans l'épissage. Parmi les candidats potentiels, on peut noter les RBP1 et 7 dont la transcription est activée en réponse à l'ozone (Chapitre 3). Des expériences avec une lignée mutante de *RBP1* (At1g58470) et *RBP7* (At2g21660) peuvent être envisagées pour confirmer leurs interventions dans la régulation du gène *GORK*.

Notre modèle d'étude a également permis de montrer d'autres aspects de la PCD induite en réponse à l'ozone notamment la stimulation d'activités de type caspase. Comme le suggère les résultats du Chapitre 4, la stimulation d'activité de type caspase lors de l'AVD induite par l'O₃, n'implique pas de façon évidente comme chez divers modèles animaux, la diminution de la teneur en K⁺ intracellulaire permettant l'activation des caspases-1. Ce travail sur les activités caspases pourrait être approfondi en utilisant une pharmacologie spécifique à chaque type de caspase, comme le Ac-DEVD-CHO qui inhibe les activités caspases-3 ou le Z-WEHD-FMK qui inhibe les activités caspases-1. En effet, lors de la PCD impliquant la vacuole, une voie dite 'destructrice' fait intervenir des activités de type caspase-1 et la seconde voie dite 'non destructrice' implique une sous-unité PBA1 du

protéasome ayant une activité de type caspase-3 (Yang et al., 2004; Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). D'autres types d'enzyme présentant des activités de type caspase ont été démontrés chez les plantes qui possèdent un site de clivage dépendant de la sérine, les subtilases. Ces subtilases regroupant les phytospases et les saspases ont un rôle dans la PCD lors de stress biotiques et abiotiques (Vartapetian et al., 2011). Ces différentes pharmacologies seraient intéressantes à utiliser que ce soit dans la régulation de la mort, dans la régulation de l'activation au niveau cellulaire mais aussi au niveau des activités spécifiques des caspases à partir de protéines purifiées. Ces activités spécifiques pourraient être également étudiées en modulant différents paramètres comme la nature des ROS (MV, H₂O₂, KO₂,...), le pH (compartimentation cellulaire) ou la concentration des ions (anions, K⁺) afin de déterminer quels événements cellulaires sont susceptibles de participer à la régulation fine de cette machinerie cellulaire amenant à la PCD.

La voie impliquant la mitochondrie et l'oxygène singulet nécessite également des investigations plus poussées afin de mettre évidence leurs rôles dans la PCD. Le rôle et l'importance de l'oxygène singulet dans les voies de signalisation devient de plus en plus évident (Triantaphylides & Havaux, 2009). L'intérêt est donc grandissant pour connaître son positionnement dans la voie de signalisation induite lors de stress, et plus particulièrement en réponse l'O₃. Du fait de son effet très oxydant et du burst oxydatif qu'il induit, l'ozone est un bon outil pour l'étude des cascades de signalisation intervenant lors des stress oxydants. Dans ce sens, il peut servir à mieux comprendre le réseau complexe de voies de signalisation et les interactions qui interviennent, notamment avec les canaux ioniques dans les réponses aux ROS, ainsi que dans les mécanismes de défense des plantes face aux stress abiotiques et biotiques. Dans le Chapitre 2, nous avons montré une source possible d'¹O₂ à partir de l'ascorbate, mais d'autres sources peuvent exister dans la cellule végétale comme les chloroplastes. Il est notable, dans nos résultats, que le scavenger d'¹O₂ (DABCO) permet de contrer partiellement la dépolarisation mitochondriale observée en réponse à l'O₃ suggérant que ces mitochondries sont une cible ou une source potentielle de l'¹O₂. Cette dépolarisation mitochondriale pourrait refléter l'ouverture d'un canal connu comme le pore de transition membranaire (PTP). Lors de l'apoptose animal, l'ouverture du PTP conduit augmentation du potentiel osmotique de la mitochondrie, et la rupture de celle-ci (Kusano et al., 2009). Cette modification entraîne alors à une libération de cytochrome c qui active les caspases (Adrain & Martin, 2001). Le rôle du cytochrome c dans la PCD induite par l'O₃ pourrait donc être recherché notamment dans la régulation des canaux ioniques chez *A. thaliana*, celui étant connu pour activer les canaux K⁺ lors de l'apoptose (Platoshyn et al., 2002).

Enfin, il serait également intéressant de poursuivre ce travail en recherchant l'importance des régulations d'évènements mis en évidence dans ce travail, lors d'expositions chroniques et plus faibles à l'O₃. En effet, des expositions faibles à l'O₃ induisant un niveau faible de ROS, ne permettent pas le développement de la PCD mais peuvent jouer sur la productivité végétale en modifiant le métabolisme lorsque cette exposition est chronique (Ashmore, 2005). Cela permettrait de discriminer les événements et/ou de déterminer les seuils d'intensité nécessaires pour induire la PCD. De plus, avec une activité industrielle de plus en plus importante, les différents polluants

secondaires se multiplient et peuvent se trouver en infime quantité dans l'atmosphère. De ce fait, leur niveau toxicité pour la santé humaine et pour les plantes est souvent ignoré/non évalué. Certains peuvent avoir des effets synergiques avec l'O₃ et peuvent provoquer des effets délétères sur les cellules végétales, même avec de faible niveau d'O₃. Ainsi, une autre piste intéressante serait de tester les éventuels effets synergiques de différents polluants atmosphériques et discriminer quels sont les déterminants majeurs et/ou communs à ces polluants dans le cadre de la mise en place de la PCD chez les plantes.

Annexes

Annexe A1 : Arrêté européen

DIRECTIVE 2002/3/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 12 février 2002 relative à l'ozone dans l'air ambiant

LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION
EUROPÉENNE,

vu le traité instituant la Communauté européenne, et notamment son article 175, paragraphe 1,

vu la proposition de la Commission ⁽¹⁾,

vu l'avis du Comité économique et social ⁽²⁾,

vu l'avis du Comité des régions ⁽³⁾,

statuant conformément à la procédure prévue à l'article 251 du traité ⁽⁴⁾, au vu du projet commun approuvé par le comité de conciliation le 10 décembre 2001,

considérant ce qui suit:

- (1) Sur la base des principes énoncés à l'article 174 du traité le cinquième programme d'action pour l'environ-

neuvrant dans ce domaine. La Commission doit tenir compte des données les plus récentes de la recherche scientifique dans les domaines épidémiologique et environnemental concernés ainsi que des progrès les plus récents de la métrologie pour réexaminer les éléments sur lesquels se fondent ces seuils.

- (5) La directive 96/62/CE exige que des valeurs limites et/ou cibles soient fixées pour l'ozone. Vu la nature transfrontière de la pollution par l'ozone, il convient de fixer, au niveau communautaire, des valeurs cibles pour garantir la protection de la santé humaine et de la végétation. Il y a lieu de lier celles-ci aux objectifs intermédiaires issus de la stratégie communautaire intégrée de lutte contre l'acidification et l'ozone troposphérique, sur lesquels se fonde également la directive 2001/81/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2001 fixant des plafonds d'émission nationaux pour certains polluants

DÉFINITIONS, VALEURS CIBLES ET OBJECTIFS À LONG TERME POUR L'OZONE

I. Définitions

Toutes les valeurs doivent être exprimées en $\mu\text{g}/\text{m}^3$. L'expression du volume doit être ramenée aux conditions de température et de pression suivantes: 293 K et 101,3 kPa. Le temps doit être indiqué en heures de l'Europe centrale.

AOT40 (exprimé en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ par heure) signifie la somme des différences entre les concentrations horaires supérieures à $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (= 40 parties par milliard) et $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ durant une période donnée en utilisant uniquement les valeurs sur 1 heure mesurées quotidiennement entre 8 heures et 20 heures (heure de l'Europe centrale) ⁽⁵⁾.

Pour être valables, les données annuelles sur les dépassements utilisées pour contrôler la conformité avec les valeurs cibles et les objectifs à long terme ci-dessous doivent respecter les critères définis au point II de l'annexe III.

II. Valeurs cibles pour l'ozone

	Paramètre	Valeur cible pour 2010 (a) ⁽¹⁾
1. Valeur cible pour la protection de la santé humaine	Maximum journalier de la moyenne sur 8 heures (b)	120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ valeur à ne pas dépasser plus de 25 jours par année civile moyenne calculée sur 3 ans (c)
2. Valeur cible pour la protection de la végétation	AOT40, calculée à partir de valeurs sur 1 heure de mai à juillet	18 000 $\mu\text{g}/\text{m}^3\cdot\text{h}$ (moyenne calculée sur 5 ans) (c)

(a) La conformité avec les valeurs cibles sera évaluée à partir de cette date. Autrement dit, 2010 sera la première année dont les données seront utilisées pour calculer la conformité sur les 3 ou 5 années suivantes, selon le cas.

(b) Le maximum journalier de la concentration moyenne sur 8 heures est sélectionnée après examen des moyennes glissantes sur huit heures, calculées à partir des données horaires et actualisées toutes les heures. Chaque moyenne sur huit heures ainsi calculée est attribuée au jour où elle s'achève, autrement dit, la première période considérée pour le calcul sur un jour donné sera la période comprise entre 17 heures la veille et 1 heure le jour même; la dernière période considérée pour un jour donné sera la période comprise entre 16 heures et minuit le même jour.

(c) Si les moyennes sur 3 ou 5 ans ne peuvent pas être déterminées sur la base d'une série complète et continue de données annuelles, les données annuelles minimales requises pour juger la conformité avec les valeurs cibles seront les suivantes:
— en ce qui concerne la valeur cible pour la protection de la santé humaine: des données valides relevées pendant un an,
— en ce qui concerne la valeur cible pour la protection de la végétation: des données valides relevées pendant trois ans.

⁽¹⁾ Ces valeurs cibles et le dépassement autorisé sont fixés sans préjudice des résultats des études et du réexamen prévu à l'article 11, qui tiendront compte des différentes situations géographiques et climatiques dans la Communauté européenne.

Bibliographie

Bibliographie

- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R** (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K(+)-selective, K(+)-sensing ion channel. *Febs Letters* **486**: 93-98
- Adrain C, Martin SJ** (2001) The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome *seas*. *Trends in Biochemical Sciences* **26**: 390-397
- Agrawal GK, Rakwal R, Yonekura M, Kubo A, Saji H** (2002) Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics* **2**: 947-959
- Agrawal GK, Rakwal R, Yonekura M, Kubo A, Saji H** (2002) Rapid induction of defense/stress-related proteins in leaves of rice (*Oryza sativa*) seedlings exposed to ozone is preceded by newly phosphorylated proteins and changes in a 66-kDa ERK-type MAPK. *Journal of Plant Physiology* **159**: 361-369
- Agrawal GK, Tamogami S, Iwahashi H, Agrawal VP, Rakwal R** (2003) Transient regulation of jasmonic acid-inducible rice MAP kinase gene (*OsBWMK1*) by diverse biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 355-361
- Ahlfors R, Brosche M, Kollist H, Kangasjarvi J** (2009) Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **58**: 1-12
- Ahlfors R, Lang S, Overmyer K, Jaspers P, Brosche M, Taurianinen A, Kollist H, Tuominen H, Belles-Boix E, Piippo M, Inze M, Palva ET, Kangasjarvi J** (2004) *Arabidopsis* radical-induced cell death1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *Plant Cell* **16**: 1925-1937
- Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Brosche M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjarvi J** (2004) Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant Journal* **40**: 512-522
- Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S, Berkowitz GA** (2007) Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* **19**: 1081-1095
- Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffman T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI** (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**: 1053-1057
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR** (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 2148-2152
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773-784
- Amicucci E, Gaschler K, Ward JM** (1999) NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and curly-leaf pondweed (*Potamogeton crispus*). *Plant Biology* **1**: 524-528
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399
- Arazi T, Sunkar R, Kaplan B, Fromm H** (1999) A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant Journal* **20**: 171-182

- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J** (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-983
- Ashmore M, Toet S, Emberson L** (2006) Ozone - a significant threat to future world food production? *New Phytologist* **170**: 201-204
- Ashmore MR** (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant Cell and Environment* **28**: 949-964
- Ashtamker C, Kiss V, Sagi M, Davydov O, Fluhr R** (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* **143**: 1817-1826
- Atkinson CJ, Davies WJ, Mansfield TA** (1989) Changes in Stomatal Conductance in Intact Aging Wheat Leaves in Response to Abscisic-Acid. *Journal of Experimental Botany* **40**: 1021-1028
- Baier M, Kandlbinder A, Goldack D, Dietz KJ** (2005) Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant Cell and Environment* **28**: 1012-1020
- Barbier-Brygoo H, Vinauger M, Colcombet J, Ephritikhine G, Frachisse J, Maurel C** (2000) Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 199-218
- Barbier-Brygoo H, Vinauger M, Colcombet J, Ephritikhine G, Frachisse JM, Maurel C** (2000) Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**: 199-218
- Barone MC, Darley-USmar VM, Brookes PS** (2003) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase by peroxynitrite proceeds through ascorbate-dependent generation of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 27520-27524
- Batistic O, Kudla J** (2004) Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* **219**: 915-924
- Becker D, Geiger D, Dunkel M, Roller A, Bertl A, Latz A, Carpaneto A, Dietrich P, Roelfsema MRG, Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B, Czempinski K, Hedrich R** (2004) AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15621-15626
- Beevers H** (1982) Glyoxysomes in higher plants. *Annals of the New York Academy of Sciences* **386**: 243-253
- Beligni MV, Lamattina L** (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215-221
- Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, Dominici F** (2004) Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000. *Jama-Journal of the American Medical Association* **292**: 2372-2378
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL** (2003) Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**: 517-529
- Bihler H, Eing C, Hebeisen S, Roller A, Czempinski K, Bertl A** (2005) TPK1 is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar cation channel. *Plant Physiology* **139**: 417-424
- Bolwell GP, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F, Rowntree EG, Wojtaszek P** (1999) Recent advances in understanding the origin of the apoplastic oxidative burst in plant cells. *Free Radical Research* **31**: S137-S145
- Bolwell GP, Wojtaszek P** (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**: 347-366
- Bortner CD, Cidlowski JA** (2007) Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: Role in apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **462**: 176-188
- Bouzigarne B, El-Maarouf-Bouteau H, Frankart C, Reboutier D, Madiona K, Pennarun AM, Monestiez M, Trouverie J, Amiar Z, Briand J, Brault M, Rona JP, Ouhdouch Y, El**

- Hadrami I, Bouteau F** (2006) Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New Phytologist* **169**: 209-218
- Bouteau F, Bousquet U, Pennarun AM, Convert M, Dellis O, Cornel D, Rona JP** (1996) Time dependent K⁺ currents through plasmalemma of laticifer protoplasts from *Hevea brasiliensis*. *Physiologia Plantarum* **98**: 97-104
- Bouteau F, Pennarun AM, Kurkdjian A, Convert M, Cornel D, Monestiez M, Rona JP, Bousquet U** (1999) Ion channels of intact young root hairs from *Medicago sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 889-898
- Bozhkov PV, Lam E** (2011) Green death: revealing programmed cell death in plants. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1239-1240
- Braut M, Amiar Z, Pennarun AM, Monestiez M, Zhang Z, Cornel D, Dellis O, Knight H, Bouteau F, Rona JP** (2004) Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in *Arabidopsis* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca²⁺ dependent. *Plant Physiology* **135**: 231-243
- Britto DT, Kronzucker HJ** (2008) Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiologia Plantarum* **133**: 637-650
- Camarasa C, Bidard F, Bony M, Barre P, Dequin S** (2001) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4144-4151
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong XN** (1994) Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired-Resistance. *Plant Cell* **6**: 1583-1592
- Castillo FJ, Heath RL** (1990) Ca²⁺ Transport in Membrane-Vesicles from Pinto Bean-Leaves and Its Alteration after Ozone Exposure. *Plant Physiology* **94**: 788-795
- CEC** (2008) La mosaïque nord-américaine : Aperçu des principaux enjeux environnementaux. *In*, **Cessna SG, Sears VE, Dickman MB, Low PS** (2000) Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* **12**: 2191-2199
- Chen YH, Hu L, Punta M, Bruni R, Hillerich B, Kloss B, Rost B, Love J, Siegelbaum SA, Hendrickson WA** (2010) Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature* **467**: 1074-U1157
- Chiu JC, Brenner ED, DeSalle R, Nitabach MN, Holmes TC, Coruzzi GM** (2002) Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 1066-1082
- Christopher DA, Borsics T, Yuen CYL, Ullmer W, Andeme-Ondzighi C, Andres MA, Kang BH, Staehelin LA** (2007) The cyclic nucleotide gated cation channel AtCNGC10 traffics from the ER via Golgi vesicles to the plasma membrane of *Arabidopsis* root and leaf cells. *Bmc Plant Biology* **7**
- Clayton H, Knight MR, Knight H, McAinsh MR, Hetherington AM** (1999) Dissection of the ozone-induced calcium signature. *Plant Journal* **17**: 575-579
- Clough SJ, Fengler KA, Yu IC, Lippok B, Smith RK, Bent AF** (2000) The *Arabidopsis* dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 9323-9328
- Colcombet J, Thomine S, Guern J, Frachisse JM, Barbier-Brygoo H** (2001) Nucleotides provide a voltage-sensitive gate for the rapid anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 36139-36145
- Coll NS, Epple P, Dangl JL** (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1247-1256
- Colquhoun D, Sivilotti LG** (2004) Function and structure in glycine receptors and some of their relatives. *Trends in Neurosciences* **27**: 337-344
- Conklin PL, Williams EH, Last RL** (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 9970-9974

- Coquoz JL, Buchala A, Metraux JP** (1998) The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiology* **117**: 1095-1101
- Corpas FJ, Palma JM, del Rio LA, Barroso JB** (2009) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist* **184**: 9-14
- Cosgrove DJ, Hedrich R** (1991) Stretch-Activated Chloride, Potassium, and Calcium Channels Coexisting in Plasma-Membranes of Guard-Cells of *Vicia-Faba* L. *Planta* **186**: 143-153
- Craker LE, Starbuck JS** (1973) Leaf age and air pollutant susceptibility: uptake of ozone and sulfur dioxide. *Environmental Research* **6**: 91-94
- Czempinski K, Frachisse JM, Maurel C, Barbier-Brygoo H, Mueller-Roeber B** (2002) Vacuolar membrane localization of the Arabidopsis 'two-pore' K⁺ channel KCO1. *Plant Journal* **29**: 809-820
- Czempinski K, Gaedeke N, Zimmermann S, Muller-Rober B** (1999) Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *Journal of Experimental Botany* **50**: 955-966
- Czempinski K, Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B** (2006) Members of the Arabidopsis AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta. *Plant Journal* **48**: 296-306
- Czempinski K, Zimmermann S, Ehrhardt T, Muller-Rober B** (1997) New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *Embo Journal* **16**: 2565-2575
- Dallaporta B, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Larochette N, Brenner C, Marzo I, Kroemer G** (1998) Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *Journal of Immunology* **160**: 5605-5615
- Daram P, Urbach S, Gaymard F, Sentenac H, Cherel I** (1997) Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *Embo Journal* **16**: 3455-3463
- Dauphin A, El-Maarouf H, Vienney N, Rona JP, Bouteau F** (2001) Effect of desiccation on potassium and anion currents from young root hairs: Implication on tip growth. *Physiologia Plantarum* **113**: 79-84
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H** (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**: 939-942
- del Rio LA, Corpas FJ, Leon AM, Barroso JB, Carreras A, Sandalio LM, Palma JM** (2004) The nitric oxide synthase activity of plant peroxisomes. *Free Radical Biology and Medicine* **36**: S41-S41
- del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141**: 330-335
- Delledonne M, Xia YJ, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588
- Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, Sokolik A, Yurin V** (2010) Arabidopsis root K⁽⁺⁾-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science* **123**: 1468-1479
- Demidchik V, Davenport RJ, Tester M** (2002) Nonselective cation channels in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 67-107
- Demidchik V, Maathuis FJM** (2007) Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* **175**: 387-404
- Demidchik V, Shang ZL, Shin R, Thompson E, Rubio L, Laohavisit A, Mortimer JC, Chivasa S, Slabas AR, Glover BJ, Schachtman DP, Shabala SN, Davies JM** (2009) Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca²⁺ channels. *Plant Journal* **58**: 903-913
- Demidchik V, Tester M** (2002) Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiology* **128**: 379-387

- Denicola A, Souza JM, Radi R** (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 3566-3571
- Dennison KL, Spalding EP** (2000) Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiology* **124**: 1511-1514
- Desikan R, Burnett EC, Hancock JT, Neill SJ** (1998) Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91-phox in Arabidopsis thaliana suspension cultures. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1767-1771
- Diatloff E, Roberts M, Sanders D, Roberts SK** (2004) Characterization of anion channels in the plasma membrane of Arabidopsis epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation. *Plant Physiology* **136**: 4136-4149
- Diatloff E, Roberts M, Sanders D, Roberts SK** (2005) Phosphate-dependent anion channel-mediated citrate efflux from Arabidopsis roots. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **141**: S222-S223
- Dietrich P, Hedrich R** (1998) Anions permeate and gate GCAC1, a voltage-dependent guard cell anion channel. *Plant Journal* **15**: 479-487
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K** (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence--a review. *Gene* **179**: 45-51
- Dominy PJ, Heath RL** (1985) Inhibition of the K⁺-Stimulated ATPase of the Plasmalemma of Pinto Bean-Leaves by Ozone. *Plant Physiology* **77**: 43-45
- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA** (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* **5**: 268-277
- Dumas B, Freyssinet G, Pallett KE** (1995) Tissue-Specific Expression of Germin-Like Oxalate Oxidase during Development and Fungal Infection of Barley Seedlings. *Plant Physiology* **107**: 1091-1096
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 10328-10333
- Dwyer SC, Legendre L, Low PS, Leto TL** (1996) Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1289**: 231-237
- Ederli L, Morettini R, Borgogni A, Wasternack C, Miersch O, Reale L, Ferranti F, Tosti N, Pasqualini S** (2006) Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiology* **142**: 595-608
- Ehrhardt T, Zimmermann S, Muller-Rober B** (1997) Association of plant K⁺(in) channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *Febs Letters* **409**: 166-170
- Elbaz M, Avni A, Weil M** (2002) Constitutive caspase-like machinery executes programmed cell death in plant cells. *Cell Death and Differentiation* **9**: 726-733
- Elzenga J, Van Volkenburgh E** (1997) Characterization of a Light-Controlled Anion Channel in the Plasma Membrane of Mesophyll Cells of Pea. *Plant Physiology* **113**: 1419-1426
- Ernst D, Schraudner M, Langebartels C, Sandermann H** (1992) Ozone-Induced Changes of Messenger-Rna Levels of Beta-1,3-Glucanase, Chitinase and Pathogenesis-Related Protein 1b in Tobacco Plants. *Plant Molecular Biology* **20**: 673-682
- Errakhi R, Dauphin A, Meimoun P, Lehner A, Reboutier D, Vatsa P, Briand J, Madiona K, Rona JP, Barakate M, Wendehenne D, Beaulieu C, Bouteau F** (2008) An early Ca²⁺ influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in Arabidopsis thaliana cells. *Journal of Experimental Botany* **59**: 4259-4270
- Errakhi R, Meimoun P, Lehner A, Vidal G, Briand J, Corbineau F, Rona JP, Bouteau F** (2008) Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3121-3129
- European Environment Agency E** (2010) State and outlook 2010 - Air pollution. *In*,

- Evans NH, McAinsh MR, Hetherington AM, Knight MR** (2005) ROS perception in *Arabidopsis thaliana*: the ozone-induced calcium response. *Plant Journal* **41**: 615-626
- Fairley K, Laver D, Walker NA** (1991) Whole-cell and single-channel currents across the plasmalemma of corn shoot suspension cells. *J Membr Biol* **121**: 11-22
- Farmer EE, Weber H, Vollenweider S** (1998) Fatty acid signaling in *Arabidopsis*. *Planta* **206**: 167-174
- Felix G, Regenass M, Spanu P, Boller T** (1994) The Protein Phosphatase Inhibitor Calyculin-a Mimics Elicitor Action in Plant-Cells and Induces Rapid Hyperphosphorylation of Specific Proteins as Revealed by Pulse Labeling with [³²P] Phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 952-956
- Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM** (1994) Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* **266**: 1068-1072
- Finkel AS, Redman S** (1984) Theory and operation of a single microelectrode voltage clamp. *J Neurosci Methods* **11**: 101-127
- Finkler A, Ashery-Padan R, Fromm H** (2007) CAMTAs: Calmodulin-binding transcription activators from plants to human. *Febs Letters* **581**: 3893-3898
- Finn JT, Grunwald ME, Yau KW** (1996) Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annual Review of Physiology* **58**: 395-426
- Forestier C, Bouteau F, Leonhardt N, Vavasseur A** (1998) Pharmacological properties of slow anion currents in intact guard cells of *Arabidopsis*. Application of the discontinuous single-electrode voltage-clamp to different species. *Pflugers Arch* **436**: 920-927
- Foyer CH, Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866-1875
- Frachisse JM, Colcombet J, Guern J, Barbier-Brygoo H** (2000) Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **21**: 361-371
- Frachisse JM, Thomine S, Colcombet J, Guern J, Barbier-Brygoo H** (1999) Sulfate is both a substrate and an activator of the voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells. *Plant Physiology* **121**: 253-261
- Furuichi T** (2005) TPC1, voltage-gated Ca²⁺-permeable channel of plant cell. *Plant and Cell Physiology* **46**: S21-S21
- Furuichi T, Cunningham KW, Muto S** (2001) A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca(2+) flux in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant and Cell Physiology* **42**: 900-905
- Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inze D, Mittler R, Van Breusegem F** (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**: 436-445
- Galon Y, Nave R, Boyce JM, Nachmias D, Knight MR, Fromm H** (2008) Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in *Arabidopsis*. *Febs Letters* **582**: 943-948
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 711-724
- Garrill A, Tyerman SD, Findlay GP, Ryan PR** (1996) Effects of NPPB and niflumic acid on outward K⁺ and Cl⁻ currents across the plasma membrane of wheat root protoplasts. *Australian Journal of Plant Physiology* **23**: 527-534
- Gauss M, Myhre G, Pitari G, Prather MJ, Isaksen ISA, Berntsen TK, Brasseur GP, Dentener FJ, Derwent RG, Hauglustaine DA, Horowitz LW, Jacob DJ, Johnson M, Law KS, Mickley LJ, Muller JF, Plantevin PH, Pyle JA, Rogers HL, Stevenson DS, Sundet JK, van Weele M, Wild O** (2003) Radiative forcing in the 21st century due to ozone changes in the troposphere and the lower stratosphere. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **108**: -
- Gauthier A, Lamotte O, Rebutier D, Bouteau F, Pugin A, Wendehenne D** (2007) Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms

- through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal Behav* **2**: 86-95
- Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferriere N, Thibaud JB, Sentenac H** (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell* **94**: 647-655
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KAS, Grill E, Romeis T, Hedrich R** (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca(2+) affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 8023-8028
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P** (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 1117-1126
- GIEC** (2007) Bilan 2007 des changements climatiques. Contribution des Groupes de travail I, II et III au quatrième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat *In*, Ed Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.), Genève, Suisse
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 909-930
- Gilliham M, Tester M** (2005) The regulation of anion loading to the maize root xylem. *Plant Physiology* **137**: 819-828
- Gladwin MT, Schechter AN, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Hogg N, Shiva S, Cannon RO, Kelm M, Wink DA, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM, Freeman BA, Lancaster JR, Feelisch M, Lundberg JO** (2005) The emerging biology of the nitrite anion. *Nature Chemical Biology* **1**: 308-314
- Gleason C, Chaudhuri S, Yang TB, Munoz A, Poovaiah BW, Oldroyd GED** (2006) Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **441**: 1149-1152
- Glyan'ko AK, Ischenko AA** (2010) Structural and Functional Characteristics of Plant NADPH Oxidase: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **46**: 463-471
- Gratao PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA** (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* **32**: 481-494
- Green MA, Fry SC** (2005) Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **433**: 83-87
- Groom QJ, Torres MA, FordhamSkelton AP, HammondKosack KE, Robinson NJ, Jones JDG** (1996) rbohA a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase gene. *Plant Journal* **10**: 515-522
- Grosskopf DG, Felix G, Boller T** (1990) K-252a Inhibits the Response of Tomato Cells to Fungal Elicitors In vivo and Their Microsomal Protein-Kinase In vitro. *Febs Letters* **275**: 177-180
- Grun S, Lindermayr C, Sell S, Durner J** (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 507-516
- Guo HW, Ecker JR** (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 40-49
- Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM** (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2601-2609
- Hamill OP, Martinac B** (2001) Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiological Reviews* **81**: 685-740
- Hara-Nishimura I, Hatsugai N** (2011) The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death Differ* **18**: 1298-1304
- Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M, Nishimura M** (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 404-408

- Hartzell HC, Qu ZQ, Yu K, Xiao QH, Chien LT** (2008) Molecular physiology of bestrophins: Multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiological Reviews* **88**: 639-672
- Haswell ES**, ed (2007) *MscS-Like Proteins in Plants*, Ed O.P. Hamill Vol Volume 58. Academic Press, San Diego, CA
- Haswell ES, Meyerowitz EM** (2006) MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **16**: 1-11
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM** (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. *Current Biology* **18**: 730-734
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* **305**: 855-858
- He R, Drury GE, Rotari VI, Gordon A, Willer M, Farzaneh T, Woltering EJ, Gallois P** (2008) Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 774-783
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM** (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**: 1968-1971
- Heath RL** (1987) The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Recent Advances in Phytochemistry* **21**: 29-54
- Hechenberger M, Schwappach B, Fischer WN, Frommer WB, Jentsch TJ, Steinmeyer K** (1996) A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 33632-33638
- Hedrich R** (1994) Voltage-Dependent Chloride Channels in Plant-Cells - Identification, Characterization, and Regulation of a Guard-Cell Anion Channel. *Chloride Channels* **42**: 1-33
- Hedrich R, Busch H, Raschke K** (1990) Ca²⁺ and Nucleotide Dependent Regulation of Voltage Dependent Anion Channels in the Plasma-Membrane of Guard-Cells. *Embo Journal* **9**: 3889-3892
- Hedrich R, Marten I** (1993) Malate-Induced Feedback-Regulation of Plasma-Membrane Anion Channels Could Provide a CO₂ Sensor to Guard-Cells. *Embo Journal* **12**: 897-901
- Hoekenga OA, Maron LG, Pineros MA, Cancado GM, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian LV** (2006) AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9738-9743
- Hughes FM, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA** (1997) Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 30567-30576
- Ivashikina N, Becker D, Ache P, Meyerhoff O, Felle HH, Hedrich R** (2001) K(+) channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *Febs Letters* **508**: 463-469
- Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL** (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* **273**: 1853-1856
- Jabs T, Tschope M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 4800-4805
- Jan LY, Jan YN** (1997) Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci* **20**: 91-123
- Jeannette E, Rona JP, Bardat F, Cornel D, Sotta B, Miginiac E** (1999) Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Journal* **18**: 13-22

- Jentsch TJ** (2008) CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**: 3-36
- Jiang J, An GY, Wang PC, Wang PT, Han JF, Jin YB, Song CP** (2003) MAP kinase specifically mediates the ABA-induced H₂O₂ generation in guard cells of *Vicia faba* L. *Chinese Science Bulletin* **48**: 1919-1926
- Jiang M, Zhang J** (2003) Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Plant Cell and Environment* **26**: 929-939
- Jonak C, Okresz L, Bogre L, Hirt H** (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 415-424
- Joo JH, Wang SY, Chen JG, Jones AM, Fedoroff NV** (2005) Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the arabidopsis oxidative stress response to ozone. *Plant Cell* **17**: 957-970
- Kadono T, Tran D, Errakhi R, Hiramatsu T, Meimoun P, Briand J, Iwaya-Inoue M, Kawano T, Bouteau F** (2010) Increased anion channel activity is an unavoidable event in ozone-induced programmed cell death. *PLoS One* **5**: e13373
- Kadono T, Yamaguchi Y, Furuichi T, Hirono M, Garrec JP, Kawano T** (2006) Ozone-induced cell death mediated with oxidative and calcium signaling pathways in tobacco bel-w3 and bel-B cell suspension cultures. *Plant Signal Behav* **1**: 312-322
- Kangasjarvi J, Jaspers P, Kollist H** (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell and Environment* **28**: 1021-1036
- Kangasjarvi J, Talvinen J, Utriainen M, Karjalainen R** (1994) Plant Defense Systems Induced by Ozone. *Plant Cell and Environment* **17**: 783-794
- Kanna M, Tamaoki M, Kubo A, Nakajima N, Rakwal R, Agrawal GK, Tamogami S, Ioki M, Ogawa D, Saji H, Aono M** (2003) Isolation of an ozone-sensitive and jasmonate-semi-insensitive *Arabidopsis* mutant (oji1). *Plant and Cell Physiology* **44**: 1301-1310
- Kanofsky JR, Sima P** (1991) Singlet Oxygen Production from the Reactions of Ozone with Biological Molecules. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 9039-9042
- Kanofsky JR, Sima PD** (1995) Singlet Oxygen Generation from the Reaction of Ozone with Plant-Leaves. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 7850-7852
- Kaplan WD, Trout WE** (1969) Behaviour of 4 neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics* **61**: 399-&
- Karley AJ, White PJ** (2009) Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 291-298
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P** (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 654-657
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C** (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91(phox) subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**: 255-266
- Kim CH, Meskauskiene R, Apel K, Laloi C** (2008) No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *Embo Reports* **9**: 435-439
- Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant Journal* **19**: 43-53
- Kirichenko A, Li L, Morandi MT, Holian A** (1996) 4-Hydroxy-2-nonenal-protein adducts and apoptosis in murine lung cells after acute ozone exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* **141**: 416-424
- Kloda A, Martinac B** (2002) Mechanosensitive channels of bacteria and archaea share a common ancestral origin. *European Biophysics Journal* **31**: 14-25
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR** (1996) Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* **8**: 489-503

- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ** (1991) Transgenic Plant Aequorin Reports the Effects of Touch and Cold-Shock and Elicitors on Cytoplasmic Calcium. *Nature* **352**: 524-526
- Koch JR, Creelman RA, Eshita SM, Seskar M, Mullet JE, Davis KR** (2000) Ozone sensitivity in hybrid poplar correlates with insensitivity to both salicylic acid and jasmonic acid. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* **123**: 487-496
- Kohler B, Raschke K** (2000) The delivery of salts to the xylem. Three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. *Plant Physiology* **122**: 243-254
- Kohler C, Merkle T, Neuhaus G** (1999) Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **18**: 97-104
- Kohler C, Neuhaus G** (2000) Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **471**: 133-136
- Kollmeier M, Dietrich P, Bauer CS, Horst WJ, Hedrich R** (2001) Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiology* **126**: 397-410
- Kovermann P, Meyer S, Hortensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, Lee Y, Martinoia E** (2007) The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant Journal* **52**: 1169-1180
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 2940-2945
- Kramarenko GG, Hummel SG, Martin SM, Buettner GR** (2006) Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. *Photochemistry and Photobiology* **82**: 1634-1637
- Krieger-Liszkay A, Fufezan C, Trebst A** (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* **98**: 551-564
- Kronzucker HJ, Britto DT** (2011) Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytologist* **189**: 54-81
- Kumar V, Jong YJI, O'Malley KL** (2008) Activated nuclear metabotropic glutamate receptor mGlu5 couples to nuclear G(q/11) proteins to generate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated nuclear Ca²⁺ release. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 14072-14083
- Kung C** (2005) A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* **436**: 647-654
- Kurkdjian A, Bouteau F, Pennarun AM, Convert M, Cornel D, Rona JP, Bousquet U** (2000) Ion currents involved in early Nod factor response in *Medicago sativa* root hairs: a discontinuous single-electrode voltage-clamp study. *Plant Journal* **22**: 9-17
- Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 32914-32920
- Kurusu T, Yagala T, Miyao A, Hirochika H, Kuchitsu K** (2005) Identification of a putative voltage-gated Ca²⁺ channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice. *Plant Journal* **42**: 798-809
- Kurz CR, Kissner R, Nauser T, Perrin D, Koppenol WH** (2003) Rapid scavenging of peroxynitrous acid by monohydroascorbate. *Free Radical Biology and Medicine* **35**: 1529-1537
- Kusano T, Tateda C, Berberich T, Takahashi Y** (2009) Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death. *Plant Cell Reports* **28**: 1301-1308
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JDG, Schroeder JI** (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* **22**: 2623-2633
- Lachaud C, Da Silva D, Cotellet V, Thuleau P, Xiong TC, Jauneau A, Briere C, Graziana A, Bellec Y, Faure JD, Ranjeva R, Mazars C** (2010) Nuclear calcium controls the apoptotic-

- like cell death induced by D-erythro-sphinganine in tobacco cells. *Cell Calcium* **47**: 92-100
- Lacombe B, Becker D, Hedrich R, DeSalle R, Hollmann M, Kwak JM, Schroeder JI, Le Novere N, Nam HG, Spalding EP, Tester M, Turano FJ, Chiu J, Coruzzi G** (2001) The identity of plant glutamate receptors. *Science* **292**: 1486-1487
- Laisk A, Kull O, Moldau H** (1989) Ozone Concentration in Leaf Intercellular Air Spaces Is Close to Zero. *Plant Physiology* **90**: 1163-1167
- Lam E** (2005) Vacuolar proteases livening up programmed cell death. *Trends in Cell Biology* **15**: 124-127
- Lam HM, Chiu J, Hsieh MH, Meisel L, Oliveira IC, Shin M, Coruzzi G** (1998) Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* **396**: 125-126
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251-275
- Langebartels C, Wohlgenuth H, Kschieschan S, Grun S, Sandermann H** (2002) Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 567-575
- Lecourieux-Ouaked F, Pugin A, Lebrun-Garcia A** (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogin, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 821-829
- Lecourieux D, Raneva R, Pugin A** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* **171**: 249-269
- Lee SC, Lan WZ, Kim BG, Li L, Cheong YH, Pandey GK, Lu G, Buchanan BB, Luan S** (2007) A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15959-15964
- Leng Q, Mercier RW, Hua BG, Fromm H, Berkowitz GA** (2002) Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiology* **128**: 400-410
- Leng Q, Mercier RW, Yao WZ, Berkowitz GA** (1999) Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiology* **121**: 753-761
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response. *Cell* **79**: 583-593
- Li PH, Mane SP, Sioson AA, Robinet CV, Heath LS, Bohnert HJ, Grene R** (2006) Effects of chronic ozone exposure on gene expression in *Arabidopsis thaliana* ecotypes and in *Thellungiella halophila*. *Plant Cell and Environment* **29**: 854-868
- Ligterink W, Kroj T, zurNieden U, Hirt H, Scheel D** (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**: 2054-2057
- Lin F, Ding HD, Wang JX, Zhang H, Zhang AY, Zhang Y, Tan MP, Dong W, Jiang MY** (2009) Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signalling. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3221-3238
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Gruissem W** (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* **14 Suppl**: S389-400
- Ludewig U, von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Krebs M, Stierhof YD, Schumacher K** (2007) Function of the anion transporter AtCLC-d in the trans-Golgi network. *Plant Journal* **50**: 466-474
- Ludwikow A, Kierzek D, Gallois P, Zeef L, Sadowski J** (2009) Gene expression profiling of ozone-treated *Arabidopsis abi1td* insertional mutant: protein phosphatase 2C ABI1 modulates biosynthesis ratio of ABA and ethylene. *Planta* **230**: 1003-1017
- Ludwikow A, Sadowski J** (2008) Gene networks in plant ozone stress response and tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 1256-1267
- Luwe MWF, Takahama U, Heber U** (1993) Role of Ascorbate in Detoxifying Ozone in the Apoplast of Spinach (*Spinacia-Oleracea* L) Leaves. *Plant Physiology* **101**: 969-976

- Ma W, Berkowitz GA** (2011) Ca²⁺ conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytologist* **190**: 566-572
- Ma W, Smigel A, Walker RK, Moeder W, Yoshioka K, Berkowitz GA** (2010) Leaf Senescence Signaling: The Ca²⁺-Conducting Arabidopsis Cyclic Nucleotide Gated Channel2 Acts through Nitric Oxide to Repress Senescence Programming. *Plant Physiology* **154**: 733-743
- Maathuis FJM** (2006) cGMP modulates gene transcription and cation transport in Arabidopsis roots. *Plant Journal* **45**: 700-711
- Maathuis FJM, Amtmann A** (1999) K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany* **84**: 123-133
- Mahajan S, Tuteja N** (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**: 139-158
- Mahalingam R, Jambunathan N, Gunjan SK, Faustin E, Weng H, Ayoubi P** (2006) Analysis of oxidative signalling induced by ozone in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell and Environment* **29**: 1357-1371
- Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, Hugueney P, Frey A, Marion-Poll A** (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of Arabidopsis thaliana. *Embo Journal* **15**: 2331-2342
- Marten I, Lohse G, Hedrich R** (1991) Plant-Growth Hormones Control Voltage-Dependent Activity of Anion Channels in Plasma-Membrane of Guard-Cells. *Nature* **353**: 758-762
- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML** (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**: 1646-1667
- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H** (1987) Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature* **325**: 156-159
- Mauch-Mani B, Metraux JP** (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* **82**: 535-540
- Mazars C, Xiong TC, Coursol S, Grat S, Ranjeva R** (2008) Sphingolipid metabolites selectively elicit increases in nuclear calcium concentration in cell suspension cultures and in isolated nuclei of tobacco. *Cell Calcium* **43**: 29-37
- McAinsh MR, Evans NH, Montgomery LT, North KA** (2002) Calcium signalling in stomatal responses to pollutants. *New Phytologist* **153**: 441-447
- McCabe PF, Leaver CJ** (2000) Programmed cell death in cell cultures. *Plant Molecular Biology* **44**: 359-368
- Meehl GA, Stocker TF, Collins W, Friedlingstein P, Gaye A, Gregory J, Kitoh A, Knutti R, Murphy J, Noda A, Raper S, Watterson I, Weaver A, Zhao ZC** (2007) Contribution of WorkingGroup I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In CCTPS Basis, ed, Global climate projections, Ed S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor and H. L. Miller, Eds., Cambridge, pp 747-846
- Mehlhorn H** (1990) Ethylene-Promoted Ascorbate Peroxidase-Activity Protects Plants against Hydrogen-Peroxide, Ozone and Paraquat. *Plant Cell and Environment* **13**: 971-976
- Mehlhorn H, Wellburn AR** (1987) Stress Ethylene Formation Determines Plant-Sensitivity to Ozone. *Nature* **327**: 417-418
- Meimoun P, Vidal G, Bohrer AS, Lehner A, Tran D, Briand J, Bouteau F, Rona JP** (2009) Intracellular Ca²⁺ stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav* **4**: 830-835
- Meinhard M, Grill E** (2001) Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from Arabidopsis. *Febs Letters* **508**: 443-446
- Meinhard M, Rodriguez PL, Grill E** (2002) The sensitivity of AB12 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* **214**: 775-782

- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Hedrich R, Martinoia E** (2010) AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *Plant Journal* **63**: 1054-1062
- Moeder W, Barry CS, Tauriainen AA, Betz C, Tuomainen J, Utriainen M, Grierson D, Sandermann H, Langebartels C, Kangasjarvi J** (2002) Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiology* **130**: 1918-1926
- Moeder W, Urquhart W, Ung H, Yoshioka K** (2011) The Role of Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels in Plant Immunity. *Molecular Plant* **4**: 442-452
- Moon H, Lee B, Choi G, Shin S, Prasad DT, Lee O, Kwak SS, Kim DH, Nam J, Bahk J, Hong JC, Lee SY, Cho MJ, Lim CO, Yun DJ** (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 358-363
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF** (2010) NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? *Physiologia Plantarum* **138**: 372-383
- Mudd J** (1997) Biochemical basis for the toxicity of ozone. In IM Yunus M, ed, *Plant response to air pollution*. John Wiley and Sons, New York, USA, pp 267-284
- Mudd JB, Dawson PJ, Adams JR, Wingo J, Santrock J** (1996) Reaction of ozone with enzymes of erythrocyte membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **335**: 145-151
- Murphy JJ, Delucchi MA, McCubbin DR, Kim HJ** (1999) The cost of crop damage caused by ozone air pollution from motor vehicles. *Journal of Environmental Management* **55**: 273-289
- Nakajima N, Itoh T, Takikawa S, Asai N, Tamaoki M, Aono M, Kubo A, Azumi Y, Kamada H, Saji H** (2002) Improvement in ozone tolerance of tobacco plants with an antisense DNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Plant Cell and Environment* **25**: 727-735
- Nakajimashimada J, Iida H, Tsuji FI, Anraku Y** (1991) Monitoring of Intracellular Calcium in Saccharomyces-Cerevisiae with an Apoaequorin Cdna Expression System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 6878-6882
- Nakanishi N, Shneider NA, Axel R** (1990) A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* **5**: 569-581
- Nakayama Y, Fujiu K, Sokabe M, Yoshimura K** (2007) Molecular and electrophysiological characterization of a mechanosensitive channel expressed in the chloroplasts of Chlamydomonas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5883-5888
- Naumov S, Mark G, Jarocki A, von Sonntag C** (2010) The Reactions of Nitrite Ion with Ozone in Aqueous Solution - New Experimental Data and Quantum-Chemical Considerations. *Ozone-Science & Engineering* **32**: 430-434
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K** (2008) CO2 regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* **452**: 483-U413
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I** (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **59**: 165-176
- Neubauer C, Yamamoto HY** (1994) Membrane Barriers and Mehler-Peroxidase Reaction Limit the Ascorbate Available for Violaxanthin De-Epoxidase Activity in Intact Chloroplasts. *Photosynthesis Research* **39**: 137-147
- Nishimura M, Hayashi M, Kato A, Yamaguchi K, Mano S** (1996) Functional transformation of microbodies in higher plant cells. *Cell Struct Funct* **21**: 387-393
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279

- Nurnberger T, Colling C, Hahlbrock K, Jabs T, Renelt A, Sacks WR, Scheel D** (1994) Perception and Transduction of an Elicitor Signal in Cultured Parsley Cells. *Molecular Botany: Signals and the Environment*: 173-182
- Nyathi Y, Baker A** (2006) Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1763**: 1478-1495
- O'Malley KL, Jong YJI, Gonchar Y, Burkhalter A, Romano C** (2003) Activation of metabotropic glutamate receptor mGlu5 on nuclear membranes mediates intranuclear Ca²⁺ changes in heterologous cell types and neurons. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 28210-28219
- Ogawa D, Nakajima N, Sano T, Tamaoki M, Aono M, Kubo A, Kanna M, Ioki M, Kamada H, Saji H** (2005) Salicylic acid accumulation under O₃ exposure is regulated by ethylene in tobacco plants. *Plant and Cell Physiology* **46**: 1062-1072
- Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X, Takahashi N** (2006) Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J Membr Biol* **209**: 21-29
- OMS** (2002) Rapport sur la santé dans le monde 2002 : réduire les risques et promouvoir une vie saine *In*, Genève, Suisse
- op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim CH, Danon A, Wagner D, Hideg E, Gobel C, Feussner I, Nater M, Apel K** (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 2320-2332
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA** (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6553-6557
- Orvar BL, Ellis BE** (1997) Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *Plant Journal* **11**: 1297-1305
- Overmyer K, Brosche M, Kangasjarvi J** (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science* **8**: 335-342
- Overmyer K, Brosche M, Pellinen R, Kuittinen T, Tuominen H, Ahlfors R, Keinanen M, Saarma M, Scheel D, Kangasjarvi J** (2005) Ozone-induced programmed cell death in the Arabidopsis radical-induced cell death1 mutant. *Plant Physiology* **137**: 1092-1104
- Overmyer K, Kollist H, Tuominen H, Betz C, Langebartels C, Wingsle G, Kangasjarvi S, Brader G, Mullineaux P, Kangasjarvi J** (2008) Complex phenotypic profiles leading to ozone sensitivity in Arabidopsis thaliana mutants. *Plant Cell and Environment* **31**: 1237-1249
- Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H, Kangasjarvi J** (2000) Ozone-sensitive Arabidopsis rcd1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* **12**: 1849-1862
- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY** (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**: 305-310
- Pasqualini S, Meier S, Gehring C, Madeo L, Fornaciari M, Romano B, Ederli L** (2008) Ozone and nitric oxide induce cGMP-dependent and -independent transcription of defence genes in tobacco. *New Phytologist* **181**: 860-870
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH** (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* **15**: 939-951
- Patel AJ, Honore E** (2001) Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends in Neurosciences* **24**: 339-346
- Pauly N, Knight MR, Thuleau P, van der Luit AH, Moreau M, Trewavas AJ, Ranjeva R, Mazars C** (2000) Cell signalling - Control of free calcium in plant cell nuclei. *Nature* **405**: 754-755

- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734
- Peiter E, Maathuis FJM, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D** (2005) The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* **434**: 404-408
- Perregaux D, Gabel CA** (1994) Interleukin-1-Beta Maturation and Release in Response to Atp and Nigericin - Evidence That Potassium-Depletion Mediated by These Agents Is a Necessary and Common Feature of Their Activity. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 15195-15203
- Peters J, Chin CK** (2007) Potassium loss is involved in tobacco cell death induced by palmitoleic acid and ceramide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**: 180-186
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J** (2000) Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111-1120
- Pike SM, Adam AL, Pu XA, Hoyos ME, Laby R, Beer SV, Novacky A** (1998) Effects of *Erwinia amylovora* harpin on tobacco leaf cell membranes are related to leaf necrosis and electrolyte leakage and distinct from perturbations caused by inoculated *E-amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**: 39-60
- Pilot G, Pratelli R, Gaymard F, Meyer Y, Sentenac H** (2003) Five-group distribution of the shaker-like K⁺ channel family in higher plants. *Journal of Molecular Evolution* **56**: 418-434
- Pineros MA, Kochian LV** (2001) A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. *Plant Physiology* **125**: 292-305
- Pineros MA, Magalhaes JV, Carvalho Alves VM, Kochian LV** (2002) The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiology* **129**: 1194-1206
- Pinto DM, Blande JD, Souza SR, Nerg AM, Holopainen JK** (2010) Plant Volatile Organic Compounds (VOCs) in Ozone (O₃) Polluted Atmospheres: The Ecological Effects. *Journal of Chemical Ecology* **36**: 22-34
- Pivetti CD, Yen MR, Miller S, Busch W, Tseng YH, Booth IR, Saier MH, Jr.** (2003) Two families of mechanosensitive channel proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 66-85, table of contents
- Planchet E, Gupta KJ, Sonoda M, Kaiser WM** (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant Journal* **41**: 732-743
- Platoshyn O, Zhang S, McDaniel SS, Yuan JXJ** (2002) Cytochrome c activates K⁺ channels before inducing apoptosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **283**: C1298-C1305
- Popham PL, Pike SM, Novacky A** (1995) The Effect of Heroin from *Erwinia-Amylovora* on the Plasmalemma of Suspension-Cultured Tobacco Cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **47**: 39-50
- Prasad TK** (1996) Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: Changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant Journal* **10**: 1017-1026
- Pryor WA** (1994) Mechanisms of Radical Formation from Reactions of Ozone with Target Molecules in the Lung. *Free Radical Biology and Medicine* **17**: 451-465
- Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJA** (2006) Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **291**: R491-R511

- Puckette M, Peal L, Steele J, Tang YH, Mahalingam R** (2009) Ozone responsive genes in *Medicago truncatula*: Analysis by suppression subtraction hybridization. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1284-1295
- Qi Z, Verma R, Gehring C, Yamaguchi Y, Zhao YC, Ryan CA, Berkowitz GA** (2010) Ca²⁺ signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 21193-21198
- Rakwal R, Komatsu S** (2004) Abscisic acid promoted changes in the protein profiles of rice seedling by proteome analysis. *Molecular Biology Reports* **31**: 217-230
- Rao MV, Davis KR** (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant Journal* **17**: 603-614
- Rao MV, Davis KR** (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta* **213**: 682-690
- Rao MV, Koch JR, Davis KR** (2000) Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biology* **44**: 345-358
- Rao MV, Lee H, Creelman RA, Mullet JE, Davis KR** (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* **12**: 1633-1646
- Rao MV, Lee H, Davis KR** (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant Journal* **32**: 447-456
- Rao MV, Paliyath C, Ormrod DP** (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110**: 125-136
- Reboutier D, Bianchi M, Brault M, Roux C, Dauphin A, Rona JP, Legue V, Lapeyrie F, Bouteau F** (2002) The indolic compound hypaphorine produced by ectomycorrhizal fungus interferes with auxin action and evokes early responses in nonhost *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 932-938
- Reboutier D, Frankart C, Briand J, Biligui B, Laroche S, Rona JP, Barny MA, Bouteau F** (2007) The HrpN(ea) harpin from *Erwinia amylovora* triggers differential responses on the nonhost *Arabidopsis thaliana* cells and on the host apple cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 94-100
- Reboutier D, Frankart C, Briand J, Biligui B, Rona JP, Haapalainen M, Barny MA, Bouteau F** (2007) Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science* **120**: 3271-3278
- Reboutier D, Frankart C, Vedel R, Brault M, Duggleby RG, Rona JP, Barny MA, Bouteau F** (2005) A CFTR chloride channel activator prevents HrpN(ea)-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 567-572
- Ren DT, Yang HP, Zhang SQ** (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 559-565
- Requena L, Bornemann S** (1999) Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme. *Biochemical Journal* **343**: 185-190
- Richards BK, Steenhuis TS, Peverly JH, McBride MB** (1998) Metal mobility at an old, heavily loaded sludge application site. *Environmental Pollution* **99**: 365-377
- Roberts SK** (2006) Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist* **169**: 647-666
- Runeckles VC, Chevone BI** (1992) Crop responses to ozone. In AS Lefohn, ed, *Surface Level Ozone Exposures and Their Effects on Vegetation*, Ed A.S. Lefohn. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, MI, USA., pp 189-270
- Ryan PR, Skerrett M, Findlay GP, Delhaize E, Tyerman SD** (1997) Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6547-6552
- Sagi M, Fluhr R** (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* **141**: 336-340
- Saji S, Bathula S, Tamaoki M, Kanna M, Aono M, Nakajima N, Nakaji T, Takeda T, Asayama M, Saji H, Kubo A** (2008) Disruption of a gene encoding C-4-dicarboxylate transporter-

- like protein increases ozone sensitivity through deregulation of the stomatal response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **49**: 2-10
- Samuel MA, Ellis BE** (2002) Double jeopardy: Both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. *Plant Cell* **14**: 2059-2069
- Samuel MA, Miles GP, Ellis BE** (2000) Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant Journal* **22**: 367-376
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**: S401-S417
- Sasaki T, Mori IC, Furuichi T, Munemasa S, Toyooka K, Matsuoka K, Murata Y, Yamamoto Y** (2010) Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. *Plant and Cell Physiology* **51**: 354-365
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H** (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant Journal* **37**: 645-653
- Schmidt C, Schelle I, Liao YJ, Schroeder JI** (1995) Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9535-9539
- Schmidt C, Schroeder JI** (1994) Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma-Membrane of Guard-Cells - Large Nitrate Permeability. *Plant Physiology* **106**: 383-391
- Schonknecht G, Spoomaker P, Steinmeyer R, Bruggeman L, Ache P, Dutta R, Reintanz B, Godde M, Hedrich R, Palme K** (2002) KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel. *Febs Letters* **511**: 28-32
- Schroeder JI, Keller BU** (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5025-5029
- Schroeder JI, Schmidt C, Sheaffer J** (1993) Identification of High-Affinity Slow Anion Channel Blockers and Evidence for Stomatal Regulation by Slow Anion Channels in Guard Cells. *Plant Cell* **5**: 1831-1841
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C** (1992) Cloning and Expression in Yeast of a Plant Potassium-Ion Transport-System. *Science* **256**: 663-665
- Shabala S, Cuin TA** (2008) Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* **133**: 651-669
- Shih TM, Goldin AL** (1997) Topology of the Shaker potassium channel probed with hydrophilic epitope insertions. *J Cell Biol* **136**: 1037-1045
- Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP** (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant Journal* **31**: 137-147
- Skerrett M, Tyerman SD** (1994) A Channel That Allows Inwardly Directed Fluxes of Anions in Protoplasts Derived from Wheat Roots. *Planta* **192**: 295-305
- Stevenson DS, Dentener FJ, Schultz MG, Ellingsen K, van Noije TPC, Wild O, Zeng G, Amann M, Atherton CS, Bell N, Bergmann DJ, Bey I, Butler T, Cofala J, Collins WJ, Derwent RG, Doherty RM, Drevet J, Eskes HJ, Fiore AM, Gauss M, Hauglustaine DA, Horowitz LW, Isaksen ISA, Krol MC, Lamarque JF, Lawrence MG, Montanaro V, Muller JF, Pitari G, Prather MJ, Pyle JA, Rast S, Rodriguez JM, Sanderson MG, Savage NH, Shindell DT, Strahan SE, Sudo K, Szopa S** (2006) Multimodel ensemble simulations of present-day and near-future tropospheric ozone. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **111**
- Talke IN, Blaudez D, Maathuis FJ, Sanders D** (2003) CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends in Plant Science* **8**: 286-293
- Tamaoki M** (2008) The role of phytohormone signaling in ozone-induced cell death in plants. *Plant Signal Behav* **3**: 166-174
- Tamaoki M, Matsuyama T, Kanna M, Nakajima N, Kubo A, Aono M, Saji H** (2003) Differential ozone sensitivity among *Arabidopsis* accessions and its relevance to ethylene synthesis. *Planta* **216**: 552-560

- Tamaoki M, Nakajima N, Kubo A, Aono M, Matsuyama T, Saji H** (2003) Transcriptome analysis of O₃-exposed Arabidopsis reveals that multiple signal pathways act mutually antagonistically to induce gene expression. *Plant Molecular Biology* **53**: 443-456
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S** (2005) Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiology* **138**: 2337-2343
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S** (2006) Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2259-2266
- Tang DZ, Innes RW** (2002) Overexpression of a kinase-deficient form of the EDR1 gene enhances powdery mildew resistance and ethylene-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Journal* **32**: 975-983
- Tavares B, Domingos P, Dias PN, Bicho A, Feijo JA** (2011) The essential role of anionic transport in plant cells: the pollen tube as a case study. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2273-2298
- Tavernier E, Wendehenne D, Blein JP, Pugin A** (1995) Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiology* **109**: 1025-1031
- Taylor AR, Brownlee C** (2003) A novel Cl⁻ inward-rectifying current in the plasma membrane of the calcifying marine phytoplankton *Coccolithus pelagicus*. *Plant Physiology* **131**: 1391-1400
- Teardo E, Frare E, Segalla A, De Marco V, Giacometti GM, Szabo I** (2005) Localization of a putative ClC chloride channel in spinach chloroplasts. *Febs Letters* **579**: 4991-4996
- Tena G, Asai T, Chiu WL, Sheen J** (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 392-400
- The Arabidopsis genome initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Thomine S, Zimmermann S, Guern J, Barbier-Brygoo H** (1995) ATP-dependent regulation of an anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis hypocotyls*. *Plant Cell* **7**: 2091-2100
- Tingey DT, Standley C, Field RW** (1976) Stress ethylene evolution: a measure of ozone effects on plants. *Atmospheric Environment* **10**: 969-974
- Torres MA, Dangel JL** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 397-403
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91(phox)). *Plant Journal* **14**: 365-370
- Torsethagen G, Pell EJ, Assmann SM** (1999) Ozone inhibits guard cell K⁺ channels implicated in stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13577-13582
- Tosti N, Pasqualini S, Borgogni A, Ederli L, Falistocco E, Crispi S, Paolucci F** (2006) Gene expression profiles of O₃-treated Arabidopsis plants. *Plant Cell and Environment* **29**: 1686-1702
- Triantaphylides C, Havaux M** (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science* **14**: 219-228
- Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavalov A, Lam E, Bozhkov PV** (2011) Metacaspases. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1279-1288
- Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H, Kangasjarvi J** (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in Arabidopsis. *Plant Journal* **39**: 59-69
- Vahala J, Ruonala R, Keinänen M, Tuominen H, Kangasjarvi J** (2003) Ethylene insensitivity modulates ozone-induced cell death in birch. *Plant Physiology* **132**: 185-195
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J** (2008) SLAC1 is required for

- plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**: 487-U415
- Vahisalu T, Puzorjova I, Brosche M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang YS, Lindgren O, Salojarvi J, Loog M, Kangasjarvi J, Kollist H** (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant Journal* **62**: 442-453
- Van Camp W, Van Montagu M, Inze D** (1998) H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* **3**: 330-334
- van der Luit AH, Olivari C, Haley A, Knight MR, Trewavas AJ** (1999) Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiology* **121**: 705-714
- van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur LA, Petersen M, Smertenko A, Taliansky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV** (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1241-1246
- van Doorn WG, Woltering EJ** (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science* **10**: 117-122
- van Doorn WG, Woltering EJ** (2008) Physiology and molecular biology of petal senescence. *Journal of Experimental Botany* **59**: 453-480
- Vartapetian AB, Tuzhikov AI, Chichkova NV, Taliansky M, Wolpert TJ** (2011) A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1289-1297
- Very AA, Sentenac H** (2002) Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane. *Trends in Plant Science* **7**: 168-175
- Very AA, Sentenac H** (2003) Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 575-603
- Viard MP, Martin F, Pugin A, Ricci P, Blein JP** (1994) Protein-Phosphorylation Is Induced in Tobacco Cells by the Elicitor Cryptogein. *Plant Physiology* **104**: 1245-1249
- Villarreal NM, Martinez GA, Civello PM** (2009) Influence of plant growth regulators on polygalacturonase expression in strawberry fruit. *Plant Science* **176**: 749-757
- Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B, Czempinski K** (2006) Members of the Arabidopsis AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta. *Plant Journal* **48**: 296-306
- Vogel V, Sheetz M** (2006) Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 265-275
- Vranova E, Inze D, Van Breusegem F** (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1227-1236
- Wagner D, Przybyla D, Camp ROD, Kim C, Landgraf F, Lee KP, Wursch M, Laloi C, Nater M, Hideg E, Apel K** (2004) The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of Arabidopsis thaliana. *Science* **306**: 1183-1185
- Walz A, Zingen-Sell I, Loeffler M, Sauer M** (2008) Expression of an oxalate oxidase gene in tomato and severity of disease caused by Botrytis cinerea and Sclerotinia sclerotiorum. *Plant Pathology* **57**: 453-458
- Wan XQ, Tan JL, Lu SY, Lin CY, Hu YH, Guo ZF** (2009) Increased tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco expressing a wheat oxalate oxidase gene via induction of antioxidant enzymes is mediated by H₂O₂. *Physiologia Plantarum* **136**: 30-44
- Wang G, Kawakami K, Gick G** (2007) Regulation of Na,K-ATPase alpha1 subunit gene transcription in response to low K(+): role of CRE/ATF- and GC box-binding proteins. *Journal of Cellular Physiology* **213**: 167-176
- Wang SJ, Sihra TS** (2004) Noncompetitive metabotropic glutamate(5) receptor antagonist (E)-2-methyl-6-styryl-pyridine (SIB1893) depresses glutamate release through inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ entry in rat cerebrocortical nerve terminals (synaptosomes). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **309**: 951-958

- Wang XK, Zheng QW, Yao FF, Chen Z, Feng ZZ, Manning WJ** (2007) Assessing the impact of ambient ozone on growth and yield of a rice (*Oryza sativa* L.) and a wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar grown in the Yangtze Delta, China, using three rates of application of ethylenediurea (EDU). *Environmental Pollution* **148**: 390-395
- Ward JM, Maser P, Schroeder JI** (2009) Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Annual Review of Physiology* **71**: 59-82
- Ward JM, Pei ZM, Schroeder JI** (1995) Roles of Ion Channels in Initiation of Signal-Transduction in Higher-Plants. *Plant Cell* **7**: 833-844
- Watanabe T, Seo S, Sakai S** (2001) Wound-induced expression of a gene for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and ethylene production are regulated by both reactive oxygen species and jasmonic acid in *Cucurbita maxima*. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 121-127
- Webb AAR, McAinsh MR, Taylor JE, Hetherington AM** (1996) Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Advances in Botanical Research*, Vol 22 **22**: 45-96
- Wei YD, Zhang ZG, Andersen CH, Schmelzer E, Gregersen PL, Collinge DB, Smedegaard-Petersen V, Thordal-Christensen H** (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology* **36**: 101-112
- Weiser T, Bentrup FW** (1993) Pharmacology of the SV channel in the vacuolar membrane of *Chenopodium rubrum* suspension cells. *J Membr Biol* **136**: 43-54
- Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse JM, Barbier-Brygoo H, Pugin A** (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* **14**: 1937-1951
- White RF** (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* **99**: 410-412
- Wieser G, Luis VC, Cuevas E** (2006) Quantification of ozone uptake at the stand level in a *Pinus canariensis* forest in Tenerife, Canary Islands: An approach based on sap flow measurements. *Environmental Pollution* **140**: 383-386
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562-565
- Wilkinson S, Bacon MA, Davies WJ** (2007) Nitrate signalling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA, and xylem sap pH in maize. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1705-1716
- Wilkinson S, Davies WJ** (2009) Ozone suppresses soil drying- and abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism. *Plant Cell and Environment* **32**: 949-959
- Williams GT, Smith CA, McCarthy NJ, Grimes EA** (1992) Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends Cell Biol* **2**: 263-267
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT** (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell and Environment* **31**: 622-631
- Wohlgemuth H, Mittelstrass K, Kschieschan S, Bender J, Weigel HJ, Overmyer K, Kangasjarvi J, Sandermann H, Langebartels C** (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell and Environment* **25**: 717-726
- Wright CA, Beattie GA** (2004) Bacterial species specificity in proU osmoinducibility and nptII and lacZ expression. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **8**: 201-208
- Wrzaczek M, Brosche M, Salojarvi J, Kangasjarvi S, Idanheimo N, Mersmann S, Robatzek S, Karpinski S, Karpinska B, Kangasjarvi J** (2010) Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of Receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*. *Bmc Plant Biology* **10**
- Wrzaczek M, Brosche M, Salojarvi J, Kangasjarvi S, Idanheimo N, Mersmann S, Robatzek S, Karpinski S, Karpinska B, Kangasjarvi J** (2010) Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of Receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*. *Bmc Plant Biology* **10**: -

- Xing T, Higgins VJ, Blumwald E** (1997) Identification of G proteins mediating fungal elicitor-induced dephosphorylation of host plasma membrane H⁺-ATPase. *Journal of Experimental Botany* **48**: 229-237
- Yalpani N, Enyedi AJ, Leon J, Raskin I** (1994) Ultraviolet-Light and Ozone Stimulate Accumulation of Salicylic-Acid, Pathogenesis-Related Proteins and Virus-Resistance in Tobacco. *Planta* **193**: 372-376
- Yamaguchi M, Sasaki T, Sivaguru M, Yamamoto Y, Osawa H, Ahn SJ, Matsumoto H** (2005) Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1). *Plant and Cell Physiology* **46**: 812-816
- Yang KY, Liu YD, Zhang SQ** (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 741-746
- Yang PZ, Fu HY, Walker J, Papa CM, Smalle J, Ju YM, Vierstra RD** (2004) Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome - Biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 6401-6413
- Yoshida S, Ioki M, Ogawa D, Sato Y, Aono M, Kubo A, Saji S, Saji H, Satoh S, Nakajima N, Tamaoki M** (2009) Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone-exposed Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum* **136**: 284-298
- Yoshioka H, Sugie K, Park HJ, Maeda H, Tsuda N, Kawakita K, Doke N** (2001) Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 725-736
- Yoshioka K, Moeder W, Kang HG, Kachroo P, Masmoudi K, Berkowitz G, Klessig DF** (2006) The chimeric Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL11/12 activates multiple pathogen resistance responses. *Plant Cell* **18**: 747-763
- Yu SP, Choi DW** (2000) Ions, cell volume, and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 9360-9362
- Zhang HJ, Dong SM, Wang MF, Wang W, Song WW, Dou XY, Zheng XB, Zhang ZG** (2010) The role of vacuolar processing enzyme (VPE) from *Nicotiana benthamiana* in the elicitor-triggered hypersensitive response and stomatal closure. *Journal of Experimental Botany* **61**: 3799-3812
- Zhang WH, Ryan PR, Sasaki T, Yamamoto Y, Sullivan W, Tyerman SD** (2008) Characterization of the TaALMT1 protein as an Al³⁺-activated anion channel in transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells. *Plant and Cell Physiology* **49**: 1316-1330
- Zhang WH, Ryan PR, Tyerman SD** (2001) Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. *Plant Physiology* **125**: 1459-1472
- Zhang WH, Ryan PR, Tyerman SD** (2004) Citrate-permeable channels in the plasma membrane of cluster roots from white lupin. *Plant Physiology* **136**: 3771-3783
- Zhang ZG, Collinge DB, Thordalchristensen H** (1995) Germin-Like Oxalate Oxidase, a H₂O₂-Producing Enzyme, Accumulates in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus. *Plant Journal* **8**: 139-145
- Zhou FS, Zhang ZG, Gregersen PL, Mikkelsen JD, de Neergaard E, Collinge DB, Thordal-Christensen H** (1998) Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiology* **117**: 33-41
- Zhou T, Boland GJ** (1999) Mycelial growth and production of oxalic acid by virulent and hypovirulent isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology- Revue Canadienne De Phytopathologie* **21**: 93-99
- Zifarelli G, Pusch M** (2010) CLC transport proteins in plants. *Febs Letters* **584**: 2122-2127
- Zimmermann S, Frachisse JM, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Guern J** (1998) Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 665-674
- Zimmermann S, Sentenac H** (1999) Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 477-482