



HAL
open science

Interactions mitochondries / chloroplastes au cours de la photosynthèse et de la réponse aux stress chez *Nicotiana sylvestris*.

Pierrick Priault

► To cite this version:

Pierrick Priault. Interactions mitochondries / chloroplastes au cours de la photosynthèse et de la réponse aux stress chez *Nicotiana sylvestris*.. Botanique. Université Paris Sud, 2006. Français. NNT: . tel-02972695v1

HAL Id: tel-02972695

<https://hal.science/tel-02972695v1>

Submitted on 20 Oct 2020 (v1), last revised 2 Jan 2021 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ORSAY

N° ORDRE :

**UNIVERSITE PARIS XI
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY**

THESE

Présentée pour obtenir le grade de :

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS SUD

Discipline : Biologie.

Spécialité : Sciences du végétal.

Par

Pierrick PRIAULT

**INTERACTIONS MITOCHONDRIES / CHLOROPLASTES
AU COURS DE LA PHOTOSYNTHESE ET DE LA
REPONSE AUX STRESS CHEZ *NICOTIANA SYLVESTRIS***

Soutenue le 3 juillet 2006 devant la Commission d'examen.

Pr	Richard	BLIGNY	Rapporteur
Dr	Franck	BRIGNOLAS	Examineur
Dr	Rosine	DE PAEPE	Examineur
Pr	Howard	GRIFFITHS	Rapporteur
Dr	Peter	STREB	

AVANT PROPOS	1
INTRODUCTION	3
<i>I. RESPIRATION ET MUTANTS RESPIRATOIRES</i>	3
I.I MITOCHONDRIE ET RESPIRATION MITOCHONDRIALE	4
I.II MUTANT MITOCHONDRIAL DE <i>NICOTIANA SYLVESTRIS</i>	6
I.II.1 PLACE DU MUTANT CMSII ETUDIE PARMIS LES MUTANTS MITOCHONDRIAUX.....	6
I.II.2 NATURE DE LA MUTATION.....	7
I.II.3 CONSEQUENCES PHYSIOLOGIQUES DE LA MUTATION	8
<i>II. MITOCHONDRIES ET PHOTOSYNTHESE</i>	10
II.I GENERALITES SUR LES CHLOROPLASTES ET LA PHOTOSYNTHESE	11
II.I.1 REACTIONS PRIMAIRES DE LA PHOTOSYNTHESE.....	12
II.I.2 REACTIONS SECONDAIRES DE LA PHOTOSYNTHESE: REDUCTION DU CO ₂	14
<i>II.I.2.a Généralités</i>	14
<i>II.I.2.b Réactions de carboxylation</i>	15
<i>II.I.2.c Régulation</i>	15
II.II BASES DE LA MODELISATION DE LA PHOTOSYNTHESE	17
II.II.1 ASSIMILATION NETTE, CINETIQUE DE CARBOXYLATION ET D'OXYGENATION ET FACTEUR DE SPECIFICITE DE LA RUBISCO, POINT DE COMPENSATION AU CO ₂ ET RESPIRATION A LA LUMIERE.....	17
II.II.2 DISCRIMINATION DES ISOTOPES DU CARBONE.....	19
II.III REPONSES DE LA PHOTOSYNTHESE AU DIOXYDE DE CARBONE	20
II.III.1 DIFFUSION DU CO ₂ DE L'ATMOSPHERE AU CHLOROPLASTE.....	20
II.III.2 COURBES DE REPONSES AU CO ₂	22
II.IV REPONSES DE LA PHOTOSYNTHESE A LA LUMIERE	22
II.V REPONSES DE LA PHOTOSYNTHESE A L'OXYGENE	24
II.VI PHOTORESPIRATION	24
II.VII RESPIRATION MITOCHONDRIALE A L'OBSCURITE ET A LA LUMIERE	25
II.VII.1 DEFINITIONS ET DETERMINISME DE LA RESPIRATION A LA LUMIERE	26
II.VII.2 COMMENT MESURER R _d	27
II.VIII ECHANGES D'ENERGIE ET DE POUVOIR REDUCTEUR	28

II.IX ACCLIMATATION DES PLANTES A L'INTENSITE LUMINEUSE DE CROISSANCE	29
II.IX.1 DEFINITIONS	29
II.IX.2 PHENOMENOLOGIE MORPHO-ANATOMIQUE ET CYTOLOGIQUE.....	29
II.IX.3 DETERMINISME	32
III. IMPACTS ET RÉPONSES DES PLANTES AU STRESS. 33	
III.I GENERALITES SUR LES FORMES ACTIVEES DE L'OXYGENE.....	34
III.I.1 EFFETS DE FORTES INTENSITES LUMINEUSES	34
III.I.2 LE METHYLVILOGENE (MV).....	35
III.I.3 LE FROID	36
III.II REPONSES DES PLANTES A CES CONTRAINTES.....	37
III.II.1 MECANISMES LIMITANT L'INCIDENCE ET/OU L'ABSORPTION DE LUMIERE.....	37
III.II.2 MECANISMES CONSOMMANT L'ENERGIE EN EXCES	38
III.II.3 SYSTEMES 'ANTIOXYDANTS' DE PROTECTION VIS A VIS DES FAO	39
III.II.4 SYSTEMES DE REPARATION DES DOMMAGES CAUSES PAR LES FAO	40
IV. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	42
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	44
I. MATERIEL VEGETAL	45
I.I NICOTIANA SYLVESTRIS WT ET CMSII.....	45
I.II CONDITIONS DE CULTURE	45
II. METHODES	46
II.I INDICES STOMATIQUES	46
II.II ABSORBANCE, REFLECTANCE ET TRANSMITTANCE	46
II.III ECHANGES GAZEUX FOLIAIRES ET FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE	46
II.III.1 Principes.....	46
II.III.2 Courbes de réponses de l'assimilation nette de CO ₂	48
II.III.2.a Réponse à l'intensité lumineuse incidente	48
II.III.2.b Réponse à la concentration en CO ₂ de l'air environnant.....	49
II.III.2.c Calcul de la limitation stomatique.....	50
II.III.2.d Réponses à la température externe	50
II.III.2.e Réponses à un traitement associant une forte intensité lumineuse et un herbicide.....	50
II.III.3 Electrode à oxygène.....	51
II.III.4 Fluorescence chlorophyllienne	53
II.III.4.a Pourquoi et comment la mesurer ?	53
II.III.4.b Paramètres de la fluorescence chlorophyllienne	53
II.III.4.c Mesures du flux cyclique d'électrons autour du PS I.....	55
II.III.4.c1 Mesure du niveau de saturation de PS I	55
II.III.4.c2 Mesure du flux cyclique des électrons autour de PS I.....	55
II.III.4.c4 Analyse des cinétiques	56
II.IV DETERMINATION DE g_m PAR ANALYSE DES ISOTOPES STABLES DU CARBONE	56

II.IV.1	Prérequis théoriques	56
II.IV.2	Dispositif expérimental	58
II.V	CALCULS BASES SUR LES MESURES CONJUGUEES DES ECHANGES GAZEUX FOLIAIRES ET DE LA FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE	59
II.V.1	Respiration à la lumière	59
II.V.2	Facteur de spécificité apparent de la Rubisco	60
II.V.3	Réactions de carboxylation et d'oxygénation de la Rubisco (vitesses et flux d'électrons) ..	60
II.VI	DOSAGE DES PROTEINES SOLUBLES TOTALES ET DES PIGMENTS	61
II.VI.1	Protéines solubles totales	61
II.VI.1.a	Extraction	61
II.VI.1.b	Dosage	62
II.VI.2	Chlorophylles et caroténoïdes	62
II.VII	ACTIVITES ENZYMATIQUES	63
II.VII.1	Catalase (CAT: EC 1.11.1.6)	63
II.VII.2	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco: EC 4.1.1.39)	63
II.VII.2.a	Extraction et dessalage des protéines solubles totales	63
II.VII.2.b	Dosage des activités initiales et totales	64
II.VII.3	Saccharose Phosphate Synthase (SPS: EC 2.4.1.14)	64
II.VII.4	NADP malate déshydrogénase (NADP-MDH: EC 1.1.1.82)	65
II.VII.5	Glycolate oxydase (G.O.: EC 1.1.3.1)	66
II.VII.6	Activité SOD sur gel (SOD: EC 1.15.1.1)	66
II.VII.6.a	Extraction des Protéines et électrophorèse PAGE	66
II.VII.6.b	Révélation des activités SOD (d'après Beauchamp et Fridovitch, 1971)	67
II.VIII	ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES TOTAUX FOLIAIRES	67
II.VIII.1	Extraction des ARNs totaux	67
II.VIII.2	Northern Blots	68
II.VIII.3	Préparation des sondes et hybridation	68
II.IX	IMMUNODETECTION DE LA PLASTIDIAL TERMINAL OXYDASE (PTOX)	69
II.IX.1	Séparation électrophorétique des protéines en gel de polyacrylamide monodimensionnel, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	69
II.IX.2	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	69
II.IX.3	Révélation immunologique	70
II.XI	PEROXYDATION MEMBRANAIRE	70
II.XI.1	Conductivité	71
II.XI.2	Dosages du malondialdéhyde	71
III	TRAITEMENTS EXPERIMENTAUX	72
III.I	DEFINITION DE L'ETAT CONSTITUTIF	72
III.II	EXPERIMENTATIONS ET DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX	72
III.II.1	Echanges gazeux foliaires	72
III.II.2	Fluorescence chlorophyllienne	72
III.II.3	Croissance des plantes sous fort CO ₂	73
III.II.4	Application d'un stress lumineux seul et en combinaison avec une basse température ou un herbicide	73
III.II.5	Expérience de récupération	74
IV	ANALYSES STATISTIQUES	74

ACCLIMATATION À L'INTENSITÉ LUMINEUSE DE CROISSANCE..... 76

I. RÉSULTATS.....76

I.I CONTEXTE..... 77

I.II ACCLIMATATION A L'INTENSITE LUMINEUSE DE CROISSANCE 77

I.II.1 RESULTATS PRELIMINAIRES 77

I.II.2 CROISSANCE ET STRUCTURE FOLIAIRES 78

I.II.2.a Croissance..... 78

I.II.2.b Structure et propriétés optiques des feuilles 78

I.II.3 PROPRIETES DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE..... 79

I.II.3.a Assimilation nette de CO₂ : A_n 79

I.II.3.b Contenu en pigments chlorophylliens..... 79

I.II.3.c Réactions primaires de la photosynthèse..... 80

I.II.3.d Réactions secondaires de la photosynthèse..... 81

I.II.4 REVERSIBILITE DE L'ACCLIMATATION 81

I.II.5 ACCLIMATATION ET REGULATION REDOX..... 82

I.III LIMITATION DE L'ASSIMILATION NETTE DE CO₂ ET CONSOMMATION DES ELECTRONS CHEZ LE CMS 350..... 83

I.III.1 RESPIRATION A L'OBSCURITE ET A LA LUMIERE 83

I.III.2 COURBES DE REPONSES A LA CONCENTRATION EN CO₂..... 84

I.III.3 COURBES DE REPONSES A LA CONCENTRATION EN O₂ 84

I.III.4 CHLORORESPIRATION ET PHOTORESPIRATION 85

I.III.5 LIMITATION STOMATIQUE..... 86

I.III.6 LIMITATION INTERNE 86

I.III.7 PROPRIETES DE LA RUBISCO 87

I.III.7.a Facteur de spécificité apparent 87

I.III.7.b Réactions de carboxylation et d'oxygénation : vitesses et flux d'électrons 88

I.IV EFFETS D'UNE EXPOSITION PLUS OU MOINS PROLONGEE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN CO₂ 88

I.III.1 CROISSANCE SOUS FORT CO₂ 88

I.III.2 DEPENDANCE DE L'ASSIMILATION NETTE ET DE L'ACTIVITE RUBISCO VIS A VIS DE c_c .. 89

II. DISCUSSION - CONCLUSIONS.....90

II.I ACCLIMATATION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE A L'INTENSITE LUMINEUSE DE CROISSANCE..... 91

II.I.1 NON AJUSTEMENT DE L'ASSIMILATION NETTE CHEZ LE CMSII CULTIVE SOUS FORT ECLAIREMENT 91

II.I.2 ACCLIMATATION CHEZ LE WT DE NICOTIANA SYLVESTRIS.....	91
II.I.3 ACCLIMATATION CHEZ LE MUTANT CMSII DE NICOTIANA SYLVESTRIS	92
II.I.4 CORRELATION ENTRE ETR, A_n ET ACT_i RUBISCO ?	93
II.I.5 ACCLIMATATION ET SIGNALISATION REDOX	97
II.II CONCLUSIONS	98
II.III ARTICLES	100
RÉPONSES AUX STRESS ABIOTIQUES	101
I. RÉSULTATS	101
I.I CONTEXTE.....	102
I.II REPONSES AUX FORTS ECLAIREMENTS ASSOCIES OU NON AU MV	102
I.II.1 FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE ET ACTIVITE CATALASE	102
<i>I.II.1.a Rapport F_v/F_m</i>	<i>103</i>
<i>I.II.1.b Activité Catalase.....</i>	<i>104</i>
I.II.2 CONTENU EN CHLOROPHYLLES	104
I.II.3 CONDUCTIVITE ET PEROXYDATION LIPIDIQUE	105
I.II.4 DIFFUSION DU MV A L'INTERIEUR DES FEUILLES ET EFFETS DU MV SUR L'ASSIMILATION NETTE DE CO ₂ ET LE TRANSPORT ELECTRONIQUE LINEAIRE CHLOROPLASTIQUE	106
<i>I.II.4.a Diffusion du MV à l'intérieur des feuilles.....</i>	<i>106</i>
<i>I.II.4.b Effets du MV sur l'assimilation nette de CO₂ et le transport électronique chloroplastique</i>	<i>107</i>
I.II.5 REPONSES AU MV EN PRESENCE D'INHIBITEURS DE LA SYNTHESE PROTEIQUE	107
I.II.6 ELEMENTS DU SYSTEME ANTIOXYDANT	108
<i>I.II.6.a Activités SOD</i>	<i>108</i>
<i>I.II.6.b Contenu en caroténoïdes</i>	<i>109</i>
I.II.7 TRANSPORT CYCLIQUE AUTOUR DU PHOTOSYSTEME I.....	110
I.III REPONSES AU FROID ASSOCIE A DE FORTS ECLAIREMENTS.....	110
I.IV RECUPERATION	111
II. DISCUSSION - CONCLUSIONS.....	113
II.I LE CMSII EST PLUS RESISTANT AU MV	114
II.I.1 LA LUMIERE SEULE N'A PAS OU PEU D'EFFET	114
II.I.2 REPONSES AU STRESS OXYDANT	114
II.II FROID ASSOCIE AUX FORTS ECLAIREMENTS = STRESS OXYDANT ?	117
II.III RECUPERATION ET CAS DU CMS 80 ?	118

II.IV CONCLUSIONS.....	119
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	123
ANNEXES	156
(1) LISTE DES EQUATIONS	156
(2) MISE EN EVIDENCE DES ISOFORMES SOD SUR GEL	161
(3) PROFILS RMN ET HPLC DES SUCRES SOLUBLES ET SUCRES-PHOSPHATES CHEZ LES PLANTES WT ET CMSII DE <i>NICOTIANA SYLVESTRIS</i> CULTIVEES SOUS 80 ET 350 μ MOLES PAR $m^{-2} s^{-1}$	163
(4) COURBES DE REPONSE DE L'ASSIMILATION NETTE ET DE LA FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE AU FROID ET A LA LUMIERE INCIDENTE.	165
ARTICLES.....	166

Avant propos

Ce travail a été réalisé sous la direction de **Peter Streb** au sein du département d'Ecophysiologie Végétale du laboratoire 'Ecologie Systématique et Evolution', UMR 8079, bâtiment 362, Université Paris Sud, 91405 Orsay cedex.

Si la lumière constitue pour les organismes photosynthétiques une source d'énergie indispensable, elle est également une source d'information très importante sur leur environnement. L'étude des mécanismes de réponses à l'environnement lumineux a beaucoup porté sur les chloroplastes, site des réactions primaires et secondaires de la photosynthèse des plantes. Il en est de même pour les réponses des plantes aux stress de type oxydatif, le chloroplaste constituant, à la lumière, le site majeur de production des Formes Activées de l'Oxygène (FAO). Récemment, un intérêt croissant a été porté sur les mitochondries végétales par analogie aux études réalisées chez les animaux, révélant, chez ces derniers, un rôle central de cet organite aussi bien comme centre d'intégration des stimuli de l'environnement, que centre de coordination et d'amplification des réponses cellulaires (Desagher et Martinou, 2000), et plus généralement dans la réponse aux stress. Le développement de mutants mitochondriaux stables et viables par reproduction sexuée a permis de réaliser d'importants progrès en se soustrayant notamment des éventuels problèmes de spécificité des effets des inhibiteurs utilisés jusqu'à présent. Parmi les mutants d'intérêts, nous pouvons citer le mutant mitochondrial à stérilité mâle cytoplasmique (ou CMS) de *Nicotiana sylvestris* obtenu et caractérisé à l'Institut de Biotechnologie des Plantes (IBP) au cours de travaux de thèse successifs (X.Q. Li, M. Pla, S. Gutierrez, C. Lelandais, M. Sabar, M. Garmier et C. Dutilleul). En outre, la stérilité mâle cytoplasmique partielle présente un intérêt en agronomie pour les espèces autogames pour la réalisation de croisements contrôlés.

I. Respiration et mutants respiratoires.

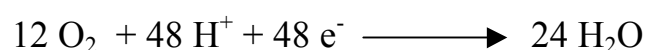
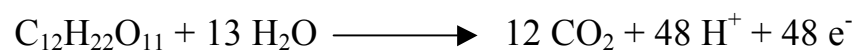
I.1 Mitochondrie et respiration mitochondriale

Les mitochondries sont de petits organites (environ 1 μm de longueur) essentiels dans les processus énergétiques cellulaires. Elles sont limitées par deux membranes aux propriétés très différentes, une membrane externe (contenant une protéine transmembranaire, la porine, qui permet le passage des ions et des métabolites hydrosolubles de masse molaire < 10000 Da) et une membrane interne présentant d'importants replis délimitant vers l'intérieur la matrice mitochondriale et vers l'extérieur, l'espace intermembranaire. Cette membrane interne est très riche en protéines et quasiment imperméable aux ions et aux métabolites hydrosolubles. Elle renferme les éléments de la chaîne respiratoire ou chaîne de transport des électrons assurant la phosphorylation oxydative.

La respiration et le catabolisme qui lui est associé dégradent des composés carbonés afin de produire de l'énergie répondant aux besoins cellulaires. Durant la respiration, l'énergie libérée est transitoirement stockée sous forme d'ATP facilement utilisé pour l'entretien et la croissance de la plante.

Le glucose est le substrat le plus communément cité pour la respiration au niveau foliaire. Toutefois, le carbone réduit peut provenir de diverses sources telles que le saccharose, les hexoses-phosphates et les trioses-phosphates, des fructanes (chez certaines Poacées telles que *Lolium perenne*) et d'autres sucres, de même que des lipides (composés primaires, les triacylglycérols), des acides organiques (malate et oxaloacétate) voire des protéines (acides aminés).

D'un point de vue de son bilan, la respiration des plantes peut être exprimée comme une réaction d'oxydoréduction couplée pour laquelle le saccharose est complètement oxydé en CO_2 ; l'oxygène servant d'accepteur d'électrons est réduit en eau :



donnant la réaction globale :



Le métabolisme respiratoire de la plante met en jeu trois processus majeurs, la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (voir *figure 1* ci-contre).

La glycolyse est un processus cytosolique générant du pyruvate à partir des intermédiaires hexoses-phosphate et trioses-phosphate (dérivés du saccharose ou de l'amidon). Ce processus produit de l'énergie sous forme d'ATP et de pouvoir réducteur, NADH (*figure 1*).

Ce pyruvate est ensuite transporté dans les mitochondries pour y être métabolisé en acétyl-coA au niveau de la matrice par le complexe PDH (pyruvate déshydrogénase). L'acétyl-coA intègre dès lors le cycle de Krebs.

Au cours du **cycle de Krebs**, l'acétyl-coA est oxydé complètement en CO₂ produisant l'équivalent de 16 NADH + 4 FADH₂ + 4 ATP par molécule de saccharose, qui seront utilisés comme substrat par la chaîne respiratoire (*figure 2*). A l'exception de la succinate déshydrogénase (localisée à la face interne des deux membranes mitochondriales), ces réactions impliquent des enzymes localisées dans la matrice mitochondriale.

Une chaîne de transport des électrons impliquant de nombreuses protéines localisées au niveau des membranes internes mitochondriales assure le transfert des électrons du NADH (ou équivalents) à l'oxygène (*figure 2* page suivante et voir description plus en détail de cette chaîne de transport des électrons au paragraphe suivant). Certaines étapes de ce transfert d'électrons sont couplées à un gradient de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, permettant la synthèse d'ATP dans la matrice à partir de l'ADP et de Pi par l'ATP synthase. C'est l'ensemble des réactions redox de la chaîne de transfert des électrons et cette synthèse d'ATP qui est appelé **phosphorylation oxydative**. Elle met en jeu cinq complexes présents au niveau de la membrane interne mitochondriale. Les quatre premiers complexes (appelés complexes I, II, III et IV pour NADH:ubiquinone oxydoréductase, succinate:ubiquinone oxydoréductase, ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase et cytochrome c oxydase respectivement), dont les structures et fonctions sont rappelées succinctement au niveau de la *figure 2*, assurent le transfert des électrons provenant de l'oxydation du NADH et/ou du FADH par l'intermédiaire de molécules mobiles, l'ubiquinone et le cytochrome c. Ce transfert est couplé pour les complexes I, II et III à la translocation des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le gradient électrochimique transmembranaire qui en résulte est utilisé par le cinquième complexe, l'ATP synthase, pour la production d'ATP (voir

figure 1). Cette voie linéaire constitue la voie de la cytochrome oxydase, voie principale de respiration chez tous les Eucaryotes.

Toutefois, chez les plantes et certains champignons, il existe des protéines supplémentaires non phosphorylantes, c'est-à-dire ne participant pas au gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire et donc à la synthèse d'ATP (voir *figure 2*). Il s'agit d'une part des **NAD(P)H déshydrogénases**, présentes au niveau des faces internes et externes de la membrane interne mitochondriale (court-circuitant le complexe I, Møller, 1997 et 2001) et d'autre part, d'une protéine homodimérique, **l'alternative oxydase** (AOX, Wagner et Moore, 1997), dont le point de branchement se situe en aval du pool d'ubiquinone, et qui court-circuite les complexes III et IV, ce qui constitue la voie dite alterne de la respiration (ou voie « AOX »). L'énergie qui y est engagée, est perdue sous forme de chaleur. La part entre la voie de la cytochrome oxydase et la voie alterne varie avec les conditions environnementales ou physiologiques comme la température, l'âge, les blessures, etc... (Kearns et al., 1992 ; Conley et Hanson, 1994). L'activation de la voie alterne, bien que défavorable en terme de production d'ATP, apparaît comme essentielle dans certaines conditions pour maintenir les composants de la chaîne respiratoire à l'état oxydé (Wagner et Moore, 1997), mais aussi en réponse à certains stress pour diminuer la production de FAO dans les mitochondries (Møller, 2001 ; thèses de doctorat de M. Garmier et C. Dutilleul, 2003) ou dans les processus de thermogenèse (Elthon et al., 1989 ; Rhoads et McIntosh, 1992-1993; McIntosh et al., 1998). La voie AOX agirait comme un carrefour de régulation métabolique permettant notamment de moduler le niveau énergétique cellulaire (proposé par Lambers en 1982: l'AOX serait activée lorsque le cytosol contiendrait un excès d'équivalents réduits et/ou un rapport ATP/ADP élevé). L'engagement vers l'AOX diminuerait la quantité d'ATP synthétisée, permettant aux processus d'oxydation des substrats par la glycolyse et le cycle de Krebs de continuer de fonctionner, pouvant maintenir ainsi un certain niveau de métabolisme carboné nécessaire à la mise en place des systèmes de défense en conditions de stress lorsque la voie de la cytochrome oxydase est perturbée.

I.II Mutant mitochondrial de *Nicotiana sylvestris*

I.II.1 Place du mutant CMSII étudié parmi les mutants mitochondriaux

Les mutants mitochondriaux stables et viables sont rares chez les plantes. Dès lors, les études portant sur le rôle de la mitochondrie dans la réponse au stress ou de l'interdépendance des

compartiments subcellulaires (par exemple lors de la mise en oeuvre des interactions mitochondries-chloroplastes dans le métabolisme photosynthétique) ont reposé généralement sur l'application d'inhibiteurs des composantes de la chaîne respiratoire mitochondriale sur des protoplastes ou morceaux de feuilles (Krömer et al., 1988 ; Igamberdiev et al., 1997 ; Padmasree et Raghavendra, 1999).

Chez les plantes, des mutants du complexe I n'ont été caractérisés que chez trois espèces : (1) *Zea mays* (les mutants NCS 2: Non Chromosomal Stripe; Newton et al., 1990; Marienfeld et Newton, 1994) ; (2) *Nicotiana sylvestris* (les mutants CMSI et CMSII: Cytoplasmic Male Sterility ; Lelandais et al., 1998 et un mutant nucléaire NMS1: Nuclear Male Sterility ; Brangeon et al., 2000) et (3) *Arabidopsis thaliana* (un mutant nucléaire *fro1*: Lee et al., 2002). Le complexe I des plantes supérieures est constitué de plus de 40 sous-unités (Heazlewood et al. 2003), et neuf d'entre elles sont codées par le génome mitochondrial. Chez le bœuf, *Escherichia coli* ou *Neurospora crassa*, le complexe I a une configuration en L, avec une partie hydrophobe membranaire et une partie périphérique matricielle. Il a été de plus mis en évidence, chez les bactéries, l'existence d'un module de connexion impliquant au moins deux sous-unités, NuoC et NuoD (Brandt et al., 2003). Chez le bœuf et *Neurospora crassa*, la sous-unité responsable de la fixation du NADH est la protéine de 51 kDa de la partie matricielle. Par analogie, chez la pomme de terre, Grohmann et al. (1996) ont identifié la protéine de 55 kDa comme étant le site de fixation du NADH, cette protéine étant codée par le génome nucléaire.

Le laboratoire 'Mitochondrie et Métabolisme' avec lequel nous collaborons étroitement, s'intéresse aux mutants CMSI et CMSII de *Nicotiana sylvestris*, dont la caractérisation aussi bien moléculaire que physiologique a beaucoup progressé ces dernières années.

1.II.2 Nature de la mutation

La Stérilité Male Cytoplasmique (CMS) rencontrée chez de nombreuses espèces résulte d'une réorganisation du génome mitochondrial (pour revue, Vedel et al., 1994). Le mutant que nous utilisons a été obtenu par culture de protoplastes à partir d'une lignée botanique de *Nicotiana sylvestris* (Li et al., 1988). Il a été montré qu'un événement de recombinaison naturel, nommé *rec1*, se produit dans le génome mitochondrial de *Nicotiana sylvestris*, entre deux séquences répétées de 106 pb (Chétrit et al., 1992). Cet événement conduit à la formation de deux molécules d'ADN recombinantes C et Δ qui restent à des niveaux sous-stoechiométriques chez le sauvage WT (pour Wild Type) par rapport à l'ADN mitochondrial circulaire « parent » (P).

Cet équilibre est modifié chez les mutant CMSII probablement suite à une perturbation de l'équilibre recombinaison/réplication lors de la culture *in vitro* (Lelandais et al., 1998, **figure 3**). La molécule C se retrouve chez ces mutants en très grande quantité et largement prédominante par rapport au cercle maître (P). Chez le mutant CMSI, un deuxième événement de recombinaison, *rec2*, intervient (non montré sur la **figure 3**, Chétrit et al., 1992). Ces événements de recombinaison ont conduit à une large délétion de l'ADNmt du cercle maître (72 kb, Chétrit et al., 1992) présente à l'état quasi homoplasmique. Cette délétion inclut une majorité de séquences présente sous forme de duplications dans d'autres régions du génome mitochondrial (ex. *nad1/B*, *rrn26*, ...), mais également le gène *nad7* (codant pour une sous-unité matricielle du complexe I, la NADH:Ubiquinone oxydoréductase, premier complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale, **figure 2**), et la région promotrice de *nad1* (Pla et al., 1995 ; Gutierrez et al., 1999). Il est intéressant de noter ici que NAD7 et NAD9 sont les homologues des sous-unités NuoC et NuoD bactériennes appartenant à un module de connexion au sein du complexe I (Brandt et al., 2003). La perte du gène *nad7*, présent en copie unique dans le génome mitochondrial, conduit à un assemblage incorrect du complexe I, à une perte totale de son activité (Gutierrez et al., 1997) mais également, ce qui n'a été montré que très récemment, à une absence totale de ce complexe (Pineau et al., 2005, **figure 3**).

1.II.3 Conséquences physiologiques de la mutation

Ce changement de structure du génome mitochondrial entraîne de nombreuses modifications phénotypiques et physiologiques (voir **figure 4**) :

- la croissance est ralentie, et les dimensions des organes floraux et végétatifs sont réduites. Les feuilles sont gaufrées et étroites. Une stérilité mâle partielle, complète sous faible lumière, lui vaut le nom de CMS pour "Cytoplasmic Male Sterile" (Gutierrez et al., 1997);
- malgré l'absence de complexe I, les plantes sont viables et maintiennent un niveau de respiration des tissus végétatifs supérieur de l'ordre de 20% à celui du WT (Sabar et al., 2000 ; Dutilleul et al., 2003a) grâce à l'activation de NADPH déshydrogénases alternes internes et externes, court-circuitant le complexe I (Sabar et al., 2000, voir **figure 4**). Les mesures de respiration en présence de succinate suggèrent que l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire est similaire au WT. L'AOX est également activée *in vitro* (étude sur des mitochondries isolées de la capacité de la respiration résistante au

cyanure, qui est activée chez le mutant CMSII parallèlement à l'accumulation des transcrits et protéines AOX, Sabar et al., 2000). Ces voies alternes étant non phosphorylantes, la production d'ATP par électron est supposée inférieure chez le mutant CMSII ;

- le niveau de photosynthèse est réduit chez les plantes CMSII par rapport aux plantes WT sous CO₂ et O₂ atmosphériques et différentes intensités lumineuses incidentes par un mécanisme qui reste à élucider (Sabar et al., 2000 ; Dutilleul et al., 2003a, **figure 4**) ;

- les tissus foliaires présentent une modification des abondances de transcrits de certaines enzymes antioxydantes localisées dans différents compartiments (Dutilleul et al., 2003b ; Garmier et al., 2003, **figure 4**). Les activités globales ascorbate peroxydase, APX, et glutathion réductase, GR, sont supérieures chez les plantes CMSII par rapport aux plantes WT, ce qui n'est pas le cas de l'activité catalase (CAT (Dutilleul et al., 2003b) ;

- une résistance accrue par rapport au type sauvage à certains stress tels que la sécheresse, l'ozone, ainsi qu'une réponse différente à un stress biotique tel que le VMT (Dutilleul et al., 2003b).

Les travaux de M. Garmier et C. Dutilleul ont permis ces dernières années une approche physiologique de ce mutant en démontrant respectivement l'implication de la mitochondrie végétale dans l'état redox cellulaire et la réponse aux stress biotiques, et les répercussions de cette mutation sur les interactions subcellulaires au sein du métabolisme foliaire (Garmier, 2003 ; Dutilleul, 2003). Mon travail de thèse, basé sur l'étude de ce même mutant mitochondrial CMSII de *Nicotiana sylvestris*, s'inscrit dans cette approche et a consisté plus précisément en l'étude de l'implication de la mutation dans le métabolisme photosynthétique et les réponses aux stress abiotiques. Le présent manuscrit s'articule ainsi en trois parties : (i) un état des lieux des connaissances sur les notions mentionnées ci-dessus, (ii) les résultats, décrits de façon plus détaillée puis discutés et enfin (iii) la conclusion générale ainsi que les perspectives de ce travail.

II. Mitochondries et photosynthèse

Les plantes, comme tout organisme vivant, ont besoin d'énergie pour leur croissance, leur développement et leur reproduction. Cette énergie, produite et utilisée sous forme d'ATP, provient de la photophosphorylation (au niveau chloroplastique, que nous aborderons un peu plus loin), de la phosphorylation oxydative mitochondriale ou de la glycolyse. Les mitochondries et chloroplastes sont les deux organites majeurs impliqués dans ces processus énergétiques, les chloroplastes synthétisant de l'ATP à la lumière, les mitochondries à l'obscurité et à la lumière. Le maintien d'une respiration mitochondriale à la lumière ainsi que l'existence d'une chlororespiration ont été mis en évidence et sous entendent dès lors un dialogue étroit entre ces deux organites qui sera discuté au cours de cette introduction.

II.1 Généralités sur les chloroplastes et la photosynthèse

Les plantes sont des organismes photolithotrophes capables de synthétiser leur matière organique à partir de substances minérales (CO_2 , eau et minéraux, qu'ils puisent dans le sol, l'atmosphère ou le milieu aquatique), l'énergie étant apportée par la lumière solaire. Les chloroplastes contiennent la machinerie photosynthétique et constituent le site de l'ensemble des réactions (primaires et secondaires) de la photosynthèse. Ils sont entourés d'une enveloppe formée d'une double membrane et renferment un milieu gélatineux appelé **stroma** (contenant de nombreuses enzymes impliquées dans la transcription et traduction du matériel génétique chloroplastique ainsi que dans de nombreuses fonctions métaboliques telles que la fixation du CO_2 par la Rubisco) ainsi qu'une structure membranaire organisée en thylakoïdes, délimitant un espace intérieur : **le lumen**. L'ADN chloroplastique est représenté par un chromosome circulaire et comprend 120 à 160 kb, contenant des séquences codant pour environ 120 protéines. D'autres protéines chloroplastiques sont synthétisées par le génome nucléaire. Par exemple, la Rubisco, intervenant dans la fixation carbonée des plantes supérieures, a deux types de sous-unités : une grande sous-unité L (pour « Large ») codée par génome chloroplastique, et une petite sous-unité S (pour « Small ») par le génome nucléaire. Les petites sous-unités sont synthétisées dans le cytoplasme puis importées dans les chloroplastes où l'enzyme est assemblée (formant un complexe L_8S_8).

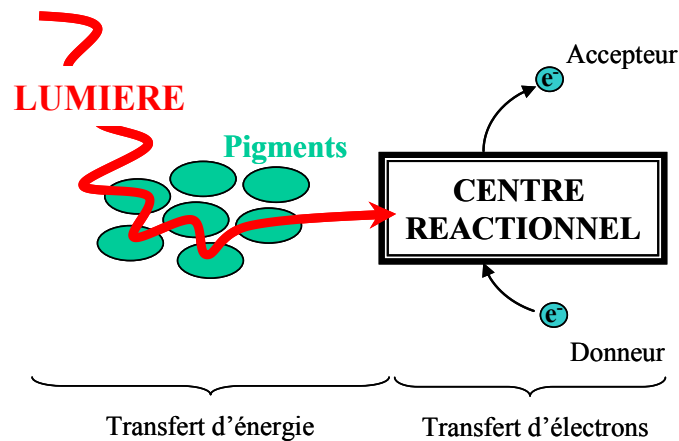
La conversion de l'énergie solaire en énergie chimique sous la forme de composés organiques est un processus complexe impliquant une chaîne de transport électronique et le métabolisme carboné photosynthétique.

L'énergie lumineuse conduit à la synthèse de carbohydrates et la production d'O₂ à partir de CO₂ et d'eau selon l'équation bilan:



II.1.1 Réactions primaires de la photosynthèse

La première phase de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique constitue les **réactions primaires de la photosynthèse**. Elle se déroule au sein des membranes thylakoïdiennes et comprend deux étapes successives : d'une part un transfert d'énergie par résonance des pigments assimilateurs au centre réactionnel, puis d'autre part un transfert d'électrons par oxydo-réductions successives jusqu'à un accepteur final (le NADP⁺).



(d'après Taiz et Zeiger, 2002).

Les pigments assimilateurs, chlorophylles et caroténoïdes, jouent dans ce système un rôle majeur. La chlorophylle intervient quant à elle, d'une part comme collecteur de lumière dans les antennes et d'autre part comme convertisseur photochimique dans les centres réactionnels des photosystèmes (P680 pour le photosystème II et P700 pour le photosystème I). Elle est présente sous deux formes chez les plantes supérieures : chlorophylle a et chlorophylle b (différant par leur spectre d'absorption de par la présence d'un groupe aldéhyde –CHO sur le noyau pyrrole, à la place d'un groupe méthyl –CH₃ pour la chlorophylle b, **figure 5**). A chaque chlorophylle-centre (chlorophylles a) sont associées quelques centaines de molécules de chlorophylle-antenne (chlorophylles a et chlorophylles b), de sorte que tout photon absorbé par l'une d'entre elles est transmis presque sans perte d'énergie par transfert de résonance au centre réactionnel qui comprend une paire (pour le photosystème II: PS II) ou deux paires (pour le photosystème I: PS I) de chlorophylles a spécialisées, seules capables de transmettre

les électrons par délocalisation de charge à un accepteur (phéophytine pour le PS II par exemple). Les caroténoïdes sont présents au niveau des membranes, des antennes collectrices (ou LHC pour Light Harvesting Complex) mais aussi des centres réactionnels et sont capables d'absorber l'énergie lumineuse dans des longueurs d'ondes de 420 à 530 nm environ (*figure 5*), puis de la transférer aux pigments chlorophylliens.

Le transfert d'énergie d'une molécule pigment à une autre (caroténoïdes, chlorophylles a et b) puis jusqu'aux centres réactionnels est rendu majoritaire du point de vue énergétique du fait d'une légère perte d'énergie à chaque transfert. A son état excité le plus bas, la chlorophylle possède 4 voies de dissipation possibles de l'énergie qu'elle contient :

- Elle peut participer au transfert d'énergie, pour lequel, une molécule excitée de chlorophylle transfère son énergie à une autre molécule.
- Elle peut participer à la **photochimie**, l'énergie de l'état excité permettant à des réactions chimiques de se produire.
- Elle peut retourner à son état stationnaire en convertissant directement son énergie d'excitation en chaleur sans émission de photon.
- Elle peut réémettre un photon et retourner à son état stationnaire, donnant la **fluorescence chlorophyllienne**. La longueur d'onde de la fluorescence est alors un peu plus élevée et les photons émis moins énergétiques que la lumière absorbée car une portion de l'énergie d'excitation est convertie en chaleur. La chlorophylle fluoresce dans la région rouge du spectre (680-695 nm à température ambiante).

Ces processus sont en compétition. Cette propriété est utilisée comme principe de l'analyse de la fluorescence chlorophyllienne, aisément mesurée *in vivo* de façon non destructrice, permettant une quantification au moins partielle de certains d'entre eux (voir chapitre Matériel et Méthodes et *figure 20* associée).

Le transfert d'électrons qui s'en suit est un processus d'oxydo-réductions impliquant des modifications chimiques des molécules, contrairement au transfert d'énergie purement physique. L'eau constitue le premier donneur d'électrons en produisant de l'oxygène via le système d'oxydation de l'eau (ou OEC pour Oxygen Evolving Complex) étroitement associé au PS II. Les processus chimiques impliqués dans la suite des réactions primaires de la

photosynthèse mettent en jeu quatre complexes protéiques majeurs (**figure 6**): le PS II (lié à l'OEC et libérant des protons dans le lumen), le cytochrome *b₆f* (Cyt *b₆f*, recevant les électrons du PS II et les délivrant au PS I, transportant également des protons du stroma vers le lumen), le PS I (réduisant le NADP⁺ en NADPH dans le stroma par action de la ferredoxine (Fd) via la flavoprotéine Ferredoxine-NADP Reductase (FNR) et l'ATP synthase (produisant l'ATP via la diffusion des protons du lumen vers le stroma). Le processus de transfert des électrons est décrit plus en détail au niveau de la **figure 6** ci-contre.

En plus de ce transfert linéaire des électrons, il existe plusieurs types de transferts alternatifs: le cycle des quinones, la chlororespiration et des transferts cycliques autour du PS I.

Le cycle des quinones, ou cycle Q, permet l'oxydation de plastoquinones (PQ) réduites par le complexe Cyt *b₆f* contenant des cytochromes à fer et des centres [Fe-S] de type Rieske. Chaque cycle implique deux PQ et libère quatre protons dans le lumen. Cette conversion de l'énergie disponible dans les PQ réduites en un gradient de protons du stroma vers le lumen, est à l'origine de la force proton motrice nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATPase.

La chlororespiration, impliquant une réduction puis ré-oxydation non photochimique du pool des PQ (quinones a et b, premiers accepteurs des électrons provenant du PS II) via respectivement une NAD(P)H déshydrogénase et une oxydase utilisant l'O₂ comme accepteur final des électrons, la PTOX (Plastidial Terminal Oxydase: Peltier et Cournac, 2002; Josse, 2003). Cette enzyme est capable de transférer les électrons des PQ à l'O₂ sans produire de formes activées de l'oxygène, FAO (Cournac et al., 2000 ; Josse et al., 2003). Elle est de plus impliquée dans la synthèse des caroténoïdes, pouvant ainsi protéger le chloroplaste et plus particulièrement la chaîne photosynthétique de transport des électrons d'une sur-réduction (Carol et Kuntz, 2001).

Deux types de **transferts cycliques des électrons autour du PSI**, permettant une synthèse d'ATP en l'absence de PS II (des électrons situés au niveau de la ferredoxine et/ou du NADPH sont redirigés vers le pool de PQ et/ou le cytochrome *b₆f*; Joët et al., 2002).

II.1.2 Réactions secondaires de la photosynthèse: réduction du CO₂

II.1.2.a Généralités

Après oxydation de l'eau en O₂ couplée à la production d'ATP et de pouvoir réducteur NADPH par les réactions se situant au niveau des membranes thylakoïdiennes que nous

venons de décrire, débute la seconde phase de la photosynthèse constituant les **réactions secondaires de la photosynthèse**. Elle consiste en des réactions de réduction du CO_2 en carbohydrates consommatrices d'ATP et de NADPH catalysées par des enzymes du stroma.

Le cycle impliqué ici est appelé **cycle de Calvin-Benson-Bassham** (CBB: *figure 7*). Il consiste globalement, via l'énergie fournie par les réactions primaires sous forme d'ATP et de pouvoir réducteur NADPH, en la fixation du CO_2 en sa réduction en molécules carbonées: l'eau et le CO_2 de l'environnement sont combinés enzymatiquement avec une molécule carbonée en C5, le ribulose-1,5-bisphosphate pour générer deux molécules intermédiaires en C3. Ces molécules sont réduites en d'autres carbohydrates par l'utilisation d'ATP et de NADPH produits par les réactions primaires de la photosynthèse. Le cycle est ensuite complété par la régénération de l'accepteur C5, le ribulose-1,5-bisphosphate.

II.1.2.b Réactions de carboxylation

La carboxylation du ribulose-1,5-bisphosphate par le CO_2 en présence d'eau est catalysée par l'enzyme chloroplastique majeure : la **Rubisco** (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase : protéine très abondante, représentant plus de 40% de l'ensemble des protéines solubles de la plupart des feuilles). La Rubisco est également capable de fixer l' O_2 (voir plus bas). Le CO_2 est ajouté au carbone 2 du ribulose-1,5-bisphosphate créant un intermédiaire réactionnel lié à l'enzyme (le 2-carboxy-3-kétoarabinitol-1,5-bisphosphate) qui est hydrolysé pour former deux molécules stables de 3-phosphoglycérate.

Le K_m de la Rubisco pour le CO_2 est suffisamment bas pour que cette réaction ait lieu même pour de faibles concentrations en CO_2 comme celles présentes dans les cellules photosynthétiques.

II.1.2.c Régulation

Deux niveaux de régulation des enzymes du cycle de Calvin-Benson-Bassham (cycle CBB) sont connus, à savoir une modification chimique de certaines enzymes cibles (régulation rédox via les ponts disulfures) ou une modification des interactions non covalentes, par exemple, par liaison d'un métabolite à un site actif de l'enzyme ou modification d'une caractéristique du milieu telle que le pH. Cinq enzymes du cycle CBB sont régulées par la lumière : la Rubisco, la NADP : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, la Fructose-1,6-bisphosphatase, la Sédoheptulose-1,7-bisphosphatase et la Ribulose-5-phosphate kinase.

Les quatre dernières enzymes contiennent un ou plusieurs groupements thiols et sont régulées via le **système ferrédoxine-thiorédoxine** (Buchanan, 1980 ; Wolosiuk et al., 1993 ; Besse et Buchanan, 1997 ; Schürmann et Jacquot, 2000). A l'obscurité, les résidus thiols sont à l'état oxydé (S-S), rendant l'enzyme inactive ou moins active. A la lumière, ces groupements sont réduits (-SH HS-), menant à l'activation de l'enzyme.

L'activité Rubisco augmente également à la lumière, mais le mécanisme impliqué est différent, l'enzyme par elle-même ne répondant pas à l'état rédox de la thiorédoxine. La Rubisco est activée par une molécule de CO₂ (autre que celle servant de substrat à la carboxylation) qui réagit avec un groupe NH₂ présent au niveau du site actif de l'enzyme : c'est la **carbamylation**. Il en résulte la formation d'un dérivé carbamate qui s'associe rapidement avec des ions Mg²⁺ pour former le complexe actif. Deux protons sont produits au cours de la formation de ce complexe actif rubisco-CO₂-Mg²⁺, donc l'activation est favorisée dans le cas d'une augmentation à la fois du pH et de la concentration en Mg²⁺.

L'accrochage de sucres phosphatés comme le ribulose-1,5-bisphosphate à la Rubisco inhibe la réaction de carbamylation. Ces sucres peuvent être enlevés via la **Rubisco activase**, réaction consommant de l'ATP. Le rôle de cette enzyme est de relarguer le plus rapidement possible les sucres phosphatés liés à la Rubisco pour la préparer à la carbamylation (Salvucci et Ögren, 1996). De récents travaux ont montré que la Rubisco activase était régulée par le système ferrédoxine-thiorédoxine (Zhang et Portis, 1999).

La Rubisco est aussi régulée par un composé naturel le carboxyarabinitol-1-phosphate, qui ressemble beaucoup au composé en C6 intermédiaire de la réaction de carboxylation. Ce composé est présent en faible concentration chez la plupart des plantes, sauf dans les graines de certaines Fabacées comme le soja et le pois.

La lumière agit également sur les mouvements d'ions pouvant influencer l'activité de la Rubisco et de certaines enzymes chloroplastiques. En effet, à la lumière, il y a pompage des protons du stroma vers le lumen des thylakoïdes couplé avec le passage d'ions Mg²⁺ dans le stroma. Ces flux modifient le pH du stroma le jour de 7 à 8, or certaines enzymes du cycle CBB (Rubisco, fructose-1,6-bisphosphatase, sédoheptulose-1,7-bisphosphatase, ribulose-5-phosphate kinase) sont plus actives à pH 8 qu'à pH 7 (Heldt, 1979).

II.II Bases de la modélisation de la photosynthèse

L'ensemble des modèles mécanistes visant à modéliser la photosynthèse des feuilles repose sur les propriétés de la Rubisco, notamment en terme de cinétique d'oxygénation et de carboxylation. En effet, la corrélation entre l'assimilation photosynthétique du CO₂ et la quantité de protéine Rubisco active dans les feuilles a été montrée dès la fin des années 60 (Björkmann, 1968). Suite à la mise en évidence de l'activité oxygénase de l'enzyme (Bowes et al., 1971), Laing et al. (1974) ont pu expliquer la sensibilité de la photosynthèse vis à vis de l'oxygène à l'aide des propriétés cinétiques de la Rubisco. Ils ont ainsi pu relier sous forme d'équations mathématiques l'assimilation de CO₂ et les vitesses maximales de carboxylation et d'oxygénation de la Rubisco, à la base de nombreux modèles (Farquhar, 1979).

Nous nous intéresserons au modèle de photosynthèse des plantes C3 développé par Farquhar et al (1980) intégrant à l'échelle d'une feuille (considérée comme un milieu homogène : absence de gradient de CO₂ et d'éclairement, fonctionnement identique de l'ensemble des chloroplastes), les échanges gazeux, les cinétiques de réaction de la Rubisco et le flux d'électrons dans les membranes photosynthétiques (pour revue, von Caemmerer, 2000).

II.II.1 Assimilation nette, cinétique de carboxylation et d'oxygénation et facteur de spécificité de la Rubisco, point de compensation au CO₂ et respiration à la lumière

L'assimilation nette de CO₂ d'une feuille dépend de l'activité carboxylase de la Rubisco dans le chloroplaste mais également du dégagement de CO₂ photorespiratoire dans la mitochondrie et de la respiration mitochondriale persistant à la lumière, R_d . Les vitesses de carboxylation (V_c) et d'oxygénation (V_o) de la Rubisco suivent une cinétique Michaélienne décrite par les équations suivantes:

$$V_c = (V_{cmax} \cdot C / K_c) / (1 + C / K_c + O / K_o) \quad (3)$$

$$\text{et } V_o = (V_{o max} \cdot O / K_o) / (1 + O / K_o + C / K_c)$$

où

$V_{c max}$ et $V_{o max}$ représentent respectivement les vitesses maximales de carboxylation et d'oxygénation de la Rubisco ;

C et O représentent les concentrations en CO₂ et O₂ au niveau des sites catalytiques de la Rubisco;

K_c et K_o représentent respectivement les constantes de vitesse de carboxylation et d'oxygénation du ribulose-1,5-bisphosphate par la Rubisco.

Ainsi, en respectant la stœchiométrie des réactions lors du cycle respiratoire (à savoir 0,5 mole de CO₂ libérée pour une mole d'O₂ fixée : l'oxygénation de deux molécules de ribulose-1,5-bisphosphate, RubP, est à l'origine de deux molécules de 2-phosphoglycolate et ainsi de deux molécules de glycine, dont la condensation en sérine dégage une molécule de CO₂, la formulation de l'assimilation nette peut s'écrire :

$$\text{où} \quad A_n = V_c - 0,5 V_o - R_d \quad (4)$$

V_c et V_o sont respectivement les vitesses de carboxylation et d'oxygénation de la Rubisco et R_d , la respiration mitochondriale à la lumière, non liée au cycle photorespiratoire.

Laing et al. (1974) ont explicité le ratio V_c / V_o :

$$\text{où} \quad V_c / V_o = S_{c/o} \cdot C / O \quad (5)$$

C et O sont les concentrations en CO₂ et O₂ aux sites actifs de la rubisco et $S_{c/o}$, le facteur de spécificité de la rubisco est exprimé à partir des constantes de Michaelis-Menten et des vitesses maximales de carboxylation et d'oxygénation de l'enzyme (K_c , K_o , $V_{c \max}$ et $V_{o \max}$) selon :

$$S_{c/o} = V_{c \max} \cdot K_o / V_{o \max} \cdot K_c \quad (6)$$

Dès lors, l'assimilation nette de CO₂ peut être réécrite en utilisant les équations (4) et (5) :

$$A_n = V_c \cdot (1 - 0,5 / S_{c/o} \cdot O / C) - R_d \quad (7)$$

En l'absence de respiration à la lumière ($R_d=0$) l'assimilation A_n s'annule pour une concentration en CO₂ dans les chloroplastes, Γ^* , telle que (d'après l'équation 4):

$$\Gamma^* = 0,5 \cdot O / S_{c/o} \quad (8)$$

En combinant avec l'équation (7), on obtient donc:

$$A_n = (1 - \Gamma^* / C) \cdot V_c - R_d \quad (9)$$

La détermination de Γ^* et de R_d est possible expérimentalement (voir **figure 12** et pages suivantes). A l'aide d'un appareil de mesures des échanges gazeux, l'assimilation nette de

CO₂, A_n, peut être déterminée. En outre, le développement de l'outil des isotopes stables ces dernières années, a permis de réaliser d'importants progrès. Les bases de la discrimination des isotopes stables du carbone au cours de la photosynthèse sont décrites au paragraphe suivant. Son utilisation pour la détermination de la conductance interne du mésophylle, et donc de la concentration en CO₂ chloroplastique, sera montrée dans le chapitre Matériels et Méthodes.

II.II.2 Discrimination des isotopes du carbone

Le CO₂ atmosphérique contient naturellement trois isotopes du carbone, ¹²C, ¹³C et ¹⁴C dans des proportions voisines de 98,9%, 1,1% et 10⁻¹⁰% respectivement. Le ¹³CO₂ présente les mêmes propriétés que le ¹²CO₂ mais la présence d'un neutron supplémentaire diminue la vitesse des réactions. C'est le cas de la fixation photosynthétique, qui discrimine contre le ¹³CO₂ et conduit ainsi à de plus faibles rapports ¹³C/¹²C dans la matière organique par rapport au CO₂ de l'air (pour revue, voir Brugnoli et Farquhar, 2000). La composition isotopique d'un échantillon, ou δ¹³C, est quantifiée par spectrométrie de masse selon l'équation:

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\left(\frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} \right) - 1 \right] \cdot 1000 \quad ; \quad \text{avec } R = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \quad (10)$$

Le standard utilisé est un fossile carbonaté, un rostre de Belemnite (Pee Dee Belemnite). Les carbonates sont riches en ¹³C; ainsi, les matières organiques sont appauvries en ¹³C par rapport au standard et auront un δ¹³C négatif.

Le CO₂ de l'air a une valeur moyenne de δ¹³C de -8‰, les plantes en C3 de -28‰ (Troughton, 1971). Ainsi, la discrimination isotopique ayant lieu au cours de l'assimilation photosynthétique de CO₂ est d'environ -8-(-28)=20‰. Deux étapes discriminantes principales sont responsables de cet appauvrissement : d'une part, la diffusion du CO₂ de l'air de l'atmosphère jusqu'à l'intérieur de la feuille (discrimination de 4,4‰; Craig, 1954) et d'autre part, la carboxylation dans les chloroplastes du RubP par la Rubisco (discrimination de 29‰; Roeske et O'Leary, 1984; Guy et al., 1993).

D'autres facteurs physiologiques interviennent également, l'un d'eux étant la valeur de c_i. Chez les C3, la discrimination potentielle d'environ 29‰ par la Rubisco n'est pas totalement exprimée à cause de la disponibilité du CO₂ au niveau des sites de carboxylation, qui devient un facteur limitant diminuant cette discrimination. La valeur de discrimination est plus forte sous fort c_i, c'est-à-dire quand les stomates sont ouverts.

Farquhar et al. (1982) ont montré que la discrimination photosynthétique du carbone (Δ) suit la relation:

$$\Delta_{(i)} = a + (b - a) \cdot c_i / c_a \quad (11)$$

où

a (4,4 ‰) représente la discrimination due à la diffusion de l'air jusqu'à l'intérieur de la feuille;

b (29 ‰) représente la discrimination due à la carboxylation enzymatique (Rubisco).

c_i/c_a représente le rapport des pressions partielles de CO₂ intercellulaire (c_i) et atmosphérique (c_a).

II.III Réponses de la photosynthèse au dioxyde de carbone

La diffusion du CO₂ de l'atmosphère, où il est présent à l'état de traces avec une pression partielle de l'ordre de 0,038% soit 380 ppm actuellement, aux chloroplastes, site où il est fixé par la Rubisco, joue un rôle très important sur la photosynthèse. En effet, l'importance du gradient développé le long de ce trajet et le niveau de l'assimilation nette de CO₂ sont très corrélés.

II.III.1 Diffusion du CO₂ de l'atmosphère au chloroplaste

Pour être assimilé, le CO₂ doit diffuser de l'atmosphère à l'intérieur de la feuille jusqu'au site de carboxylation de la Rubisco dans les chloroplastes. La cuticule qui recouvre la surface foliaire est quasi imperméable au CO₂. Dès lors, la majeure partie du CO₂ entre dans la feuille via les stomates dans les cavités sous-stomatiques puis progresse sous forme gazeuse dans les espaces intercellulaires du mésophylle. La suite du trajet se fait en phase liquide, démarrant au niveau de la couche d'eau humidifiant les parois des cellules du mésophylle et continuant à travers la membrane plasmique puis le cytosol et enfin le chloroplaste. Chaque étape de cette diffusion impose une résistance à son passage (*figure 8*).

Le trajet diffusionnel en phase gazeuse comprend le passage de la couche limite, des stomates et le trajet dans les espaces intercellulaires, chacune imposant une résistance à la diffusion du CO₂ et de l'eau. La première barrière à franchir avant d'atteindre la surface de la feuille est donc la couche d'air calme qui se développe au-dessus d'elle. Dans cette zone, les gaz suivent les lois de la diffusion moléculaire, alors qu'au-dessus, les transferts sont surtout dominés par les phénomènes de turbulence. Plus la vitesse du vent est importante au-dessus

de la feuille, plus l'épaisseur de la couche limite (et donc la résistance à la diffusion qui y est associée) est faible. Cette résistance dépendra également de la taille des feuilles et de la présence de trichomes. La résistance stomatique joue un rôle crucial : en fonction de l'état physiologique de la plante, les stomates, seuls accès pour les gaz à l'intérieur de la feuille (la cuticule étant quasi-imperméable) sont plus ou moins ouverts, ce qui favorise ou perturbe l'entrée du gaz dans la feuille. Ceci signifie que l'ensemble des facteurs qui interviennent dans les mécanismes d'ouverture et de fermeture des stomates doivent être pris en compte. Enfin, la résistance liée à la diffusion dans les espaces intercellulaires dépendra principalement de la structure interne de la feuille, notamment en termes de nombre de couches cellulaires du parenchyme palissadique, et d'espacement des cellules dans le parenchyme lacuneux.

Le CO₂ est ensuite dissous dans l'eau apoplasmique (au niveau des parois des cellules qui tapissent la cavité sous-stomatique). Le coefficient de diffusion du CO₂ à 25 °C est environ 9000 fois inférieur dans l'eau que dans l'air (Nobel, 1991) rendant la diffusion de ce gaz beaucoup plus difficile dans la phase liquide. La résistance associée à cette diffusion en phase liquide, appelée résistance du mésophylle (ou résistance interne) inclut la diffusion du CO₂ dans les espaces intercellulaires en phase gazeuse, sa dissolution en phase liquide, son entrée dans les cellules puis sa diffusion jusqu'aux sites de carboxylation à l'intérieur des chloroplastes. Malgré un coefficient de diffusion en phase aqueuse très inférieur, la conductance interne du CO₂ est du même ordre de grandeur que la conductance stomatique (Evans et al., 2004) ce qui peut être en partie attribuée d'une part à la grande surface d'échange entre les cellules du mésophylle et les espaces intercellulaires et d'autre part à la localisation des chloroplastes en périphérie des cellules, minimisant le trajet à effectuer par le CO₂ à l'intérieur des cellules. Ce positionnement des chloroplastes et l'importance des espaces intercellulaires dans une feuille sont deux caractéristiques anatomiques facilitant la diffusion interne et l'assimilation du CO₂ par les feuilles (Evans, 1999). Le CO₂ dans l'eau peut se trouver sous trois formes principales, CO₂, HCO₃⁻ et CO₃²⁻. Une enzyme, l'anhydrase carbonique interconvertit les formes CO₂ et HCO₃⁻. Les propriétés de diffusion de ces deux formes ne sont pas identiques, la forme non ionisée franchissant plus facilement les membranes plasmiques que la forme ionisée (Nobel, 1991). L'équilibre CO₂/HCO₃⁻ (en termes de concentrations) dépend du pH, un pH acide favorisant la forme CO₂ et un pH neutre favorise la formation d'HCO₃⁻. Or ces conditions de pH s'avèrent différentes au cours du trajet, avec un pH acide dans l'apoplaste (Pfanzen et Dietz, 1986 et Grignon et Sentenac, 1991), un pH cytoplasmique de 7,2 à 7,4 (Pfanzen, 1995) et un pH chloroplastique de 8 (Nobel, 1991).

La présence d'anhydrases carboniques périplasmique (Moroney et al., 2001), cytoplasmique (Moroney et al., 2001) et plastidiale (Cowan, 1986) joue ainsi un rôle probablement très important de facilitation de la diffusion du CO₂ jusqu'aux sites catalytiques de la Rubisco.

II.III.2 Courbes de réponses au CO₂

Faire figurer l'assimilation carbonée en fonction de c_i permet d'étudier la régulation de la photosynthèse par le CO₂, indépendamment de la régulation stomatique.

A de très faibles c_i , la photosynthèse est très fortement limitée. Il en résulte un efflux de CO₂ c'est à dire des valeurs négatives d'assimilation nette de CO₂ (**figure 9A**).

En augmentant le c_i à un niveau pour lequel les deux processus (fixation et production de CO₂) s'équilibrent, l'efflux net de CO₂ hors de la plante est nul : on définit ce point comme le **point de compensation pour le CO₂** (Γ , **figure 9A**). Cette concentration dépendant fortement de la température et reflète l'affinité de la feuille pour le CO₂ atmosphérique.

Chez les plantes C3, l'augmentation de c_i au-delà du point de compensation stimule l'assimilation nette de CO₂ pour une large gamme de concentrations (**figure 9A**).

Pour des concentrations faibles ou intermédiaires en CO₂, la photosynthèse est limitée par la capacité de carboxylation de la Rubisco. Pour de fortes concentrations en CO₂, la photosynthèse est limitée par la capacité du cycle CBB à régénérer la molécule acceptrice, le RubP, qui dépend du transport électronique. Des différences sont observées entre les plantes C3 et C4, l'assimilation carbonée saturant pour des valeurs de c_i plus faibles chez les plantes C4 (**figure 9A**) reflétant l'efficacité des mécanismes concentrant le CO₂ dans les cellules.

II.IV Réponses de la photosynthèse à la lumière

Un exemple de courbe de réponse à l'intensité lumineuse incidente est donné **figure 9B**.

A l'obscurité, il n'y a pas d'assimilation de CO₂, et du CO₂ est rejeté par la plante par la respiration. Considérée comme un flux algébrisé, l'assimilation carbonée apparaît négative dans cette partie de courbe (**figure 9B**).

Lorsque l'intensité lumineuse augmente, l'assimilation photosynthétique de CO₂ augmente jusqu'à atteindre un niveau équivalent à celui correspondant au dégagement de CO₂ respiratoire, puis le dépasser. Le point pour lequel l'assimilation de CO₂ compense exactement le dégagement de CO₂ est appelé **point de compensation pour la lumière** (PCL). L'intensité lumineuse nécessaire pour atteindre le PCL varie d'une espèce à une autre et selon les conditions de développement des feuilles, notamment pour des plantes cultivées sous fort éclairage ou sous ombrage (PCL respectivement de l'ordre de 10-20 μmoles PAR m⁻² s⁻¹ et de 1-5 μmoles PAR m⁻² s⁻¹, *figure 10A*). Les valeurs plus faibles pour les plantes d'ombre sont liées à la structure des antennes collectrices de lumière et la relation LHC/PS (voir chapitre suivant).

En augmentant l'intensité de la lumière incidente au-delà du point de compensation, une augmentation linéaire de l'assimilation nette de CO₂ est observée, répondant à une relation linéaire entre le flux de photons et le taux de photosynthèse. Cette partie linéaire correspond à la zone où la photosynthèse est limitée par l'intensité lumineuse incidente (*figure 9B*). La pente de cette portion linéaire de la courbe constitue **le rendement quantique maximum d'assimilation de la feuille** (RQA). Dans des feuilles intactes et sous 380 ppm de CO₂ et 21% d'O₂, les rendements quantiques de la fixation carbonée varient de 0,04 à 0,06 (Taiz et Zeiger, 2002). Sous 380 ppm de CO₂ et une atmosphère appauvrie en O₂ inhibant la photorespiration, les plantes C3 présentent un rendement de 0,1 (Taiz et Zeiger, 2002). Le RQA varie en fonction de la température et de la concentration en CO₂ du fait de leurs effets sur le rapport carboxylation/oxygénation de la Rubisco. Malgré leur différence de conditions de croissance, les plantes d'ombre et de lumière présentent des RQAs similaires (*figures 10A, 10B*).

Pour des intensités lumineuses encore supérieures, la pente de la courbe décroît et le niveau d'assimilation nette de CO₂ atteint un plateau (*figure 9B*). Quand le point de saturation est atteint, toute augmentation supplémentaire de l'intensité lumineuse n'entraîne plus d'augmentation du niveau de la photosynthèse, indiquant l'implication d'autres facteurs limitants: la photosynthèse est limitée par le CO₂. Les niveaux de saturation par l'intensité lumineuse varient pour la plupart autour de 500-1000 μmoles PAR m⁻² s⁻¹, voire plus pour des plantes de pleine lumière reflétant la plupart du temps l'intensité de lumière de croissance, ceux-ci étant plus faibles pour les plantes d'ombre (on observe des différences entre des espèces d'ombre et de lumière, *figure 10B*, et pour une même espèce, selon l'intensité lumineuse de croissance, *figure 10A*).

II.V Réponses de la photosynthèse à l'oxygène

L'oxygène atmosphérique inhibe fortement l'activité photosynthétique des plantes en C3, notamment lorsque la teneur en CO₂ est proche de celle de l'atmosphère (380 ppm). Cet effet inhibiteur de l'O₂ sur la photosynthèse est appelé effet Warburg (Warburg l'ayant décrit sur la chlorelle). L'effet Warburg sur l'assimilation du CO₂ peut être décrit comme une stimulation de la photorespiration. L'oxygène agit en effet (i) comme inhibiteur compétitif du CO₂ en tant que substrat de la Rubisco, enzyme à la fois de la fixation du CO₂ (carboxylation) et de l'O₂ (oxygénation, première étape de la photorespiration) et (ii) comme substrat de la glycolate oxydase, qui catalyse la dégradation partielle du glycolate formé par la photosynthèse en glyoxylate. Ces processus mis en commun induisent une augmentation du dégagement de CO₂ à la lumière en présence d'O₂, participant également à l'effet Warburg défini plus haut. Enfin, l'oxygène peut inhiber l'assimilation de CO₂ en acceptant les électrons provenant des ferredoxines, court-circuitant ainsi le transport non cyclique des électrons autour du PSI.

La réalisation de courbes de réponses de l'assimilation nette de CO₂ à l'intensité lumineuse et à la concentration en CO₂ incidents sous O₂ atmosphérique d'une part (21%), puis sous faible concentration en O₂ (<1%) nous apporte de premiers éléments de discussion relatifs à l'importance de la photorespiration, celle-ci étant inhibée sous fort éclaircissement et fort CO₂ et/ou faible O₂, et favorisée sous faible CO₂.

II.VI Photorespiration

Ce processus fait intervenir le chloroplaste, la mitochondrie, le peroxyosome ainsi que le cytosol. Ce terme "photorespiration" désigne l'absorption d'O₂ associée à un dégagement de CO₂ dépendante de la lumière, initiée par la fonction oxygénase de la Rubisco. En effet, l'O₂ est un inhibiteur compétitif de la fixation de CO₂, une propriété importante de la Rubisco étant sa capacité à catalyser à la fois la carboxylation et l'oxygénation du RubP (l'O₂ et le CO₂ s'incorporent au niveau de l'isomère 2,3-ène-diol du ribulose-1,5-bisphosphate).

Le rapport carboxylation/oxygénation du RuBP va dépendre principalement des concentrations des substrats CO₂ et O₂ au niveau des sites actifs de la Rubisco ainsi que des propriétés cinétiques de cette enzyme (équation 4), ces deux paramètres étant très liés à la

température. Ainsi, dans le cas d'une élévation de température, la solubilité de l'O₂ dans une solution en équilibre avec l'air ambiant décroît moins vite que celle du CO₂ induisant dès lors une augmentation de la part de la photorespiration par rapport à la photosynthèse.

Les différentes étapes de la photorespiration au sein des trois compartiments cellulaires impliqués sont décrites plus en détail au niveau de la *figure 11* ci-contre. En terme de bilan, deux molécules de 2-phosphoglycolate sont converties en une molécule de 3-phosphoglycérate (PGA, pouvant réintégrer le cycle CBB) et une molécule de CO₂ est émise dans les mitochondries. Ainsi, 75% du carbone des produits de l'oxygénation est récupéré via ce cycle et retourne au cycle CBB (Lorimer, 1981). Toutefois, le carbone "perdu" via cette molécule de CO₂ émise dans les mitochondries, peut être réassimilé, ce qui aboutit à un bilan nul en terme de carbone pour l'oxygénation du RubP. De la même façon, la molécule d'ammonium formée dans les mitochondries au cours de la formation de la molécule de sérine, peut être réassimilée et induire un bilan nul en terme de métabolisme azoté.

Le rôle de la photorespiration peut être sujet à discussion. En effet, ce cycle photorespiratoire permet la formation de 5 molécules de PGA à partir de 3 molécules de RubP, utilisant ainsi de l'énergie sans fixation nette de carbone. Toutefois, si ce n'est celle de récupérer une partie du carbone perdu par oxygénation du RubP, son implication dans le métabolisme azoté et des acides aminés notamment a été montrée (Madore et Grodzinski, 1994 ; Noctor et al., 1998-1999), ainsi que son rôle dans le recyclage du phosphoglycolate formé, ce composé pouvant inhiber la Rubisco. La photorespiration serait également importante en conditions de forte luminosité et de faible c_i , c'est-à-dire par exemple en cas de fermeture des stomates sous l'effet d'un stress hydrique. Son rôle serait de dissiper un excès d'ATP et de pouvoir réducteur des réactions primaires afin d'empêcher des dommages à la machinerie photosynthétique. Des travaux réalisés sur des plantes transgéniques montrent que la photorespiration protège les plantes C3 de la photooxydation et de la photoinhibition (Kozaki et Takeba, 1996), comme cela avait été supposé par Cornic (1976) ou Osmond (1981).

II.VII Respiration mitochondriale à l'obscurité et à la lumière

Les interactions entre la respiration mitochondriale et la photosynthèse ont fait l'objet de nombreuses recherches visant notamment à estimer si la respiration mitochondriale persiste à la lumière et si oui avec quelle intensité (Hoefnagel et al., 1998 ; Atkin et al., 2000).

II.VII.1 Définitions et déterminisme de la respiration à la lumière

A l'obscurité, la respiration (R_n : « night » respiration) implique la glycolyse et la production de CO_2 résulte du dégagement de CO_2 lié à l'activité du cycle de Krebs et à l'activité de la pyruvate déshydrogénase. La respiration à la lumière, notée R_d pour « day » respiration, peut être définie comme la respiration mitochondriale persistant à la lumière. Toutefois, les voies métaboliques qui y sont associées sont pour la plupart inconnues. De nombreuses études ont mis en évidence une R_d plus faible que R_n (Laisk, 1977, Brooks et Farquhar, 1985, pour revue: Atkin et al., 2000 ; Peisker et Apel, 2001). Le degré d'inhibition de R_n par la lumière est cependant très variable selon les espèces, l'éclairement et la température foliaire (de 16 à 77% selon Atkin et al., 2000). Il est important de noter cependant que les travaux portant sur la consommation d' O_2 à la lumière ne donnent pas de résultats nets quant à une inhibition de la consommation d' O_2 à la lumière (exemples : Peltier et Thibault, 1985 ; Calvin et al., 1980).

Le maintien d'un métabolisme respiratoire à la lumière peut répondre à différents objectifs tels que (i) le maintien de voies métaboliques nécessitant des composés issus de la mitochondrie (dont l'acétyl-coA et l'acétate pour les synthèses lipidiques), (ii) la fourniture d'ATP au cytosol pour la synthèse de saccharose notamment (Krömer, 1995), (iii) le recyclage d'une partie du Pi nécessaire à la poursuite de la photosynthèse dans les chloroplastes (Raghavendra et Padmasree, 2003) et (iv) une participation à la protection vis à vis de la photoinhibition (oxydation de composés réducteurs en excès, Saradadevi et Raghavendra, 1992).

Les causes d'une inhibition de la respiration mitochondriale à la lumière sont multiples. L'inactivation de certaines enzymes réduirait le dégagement de CO_2 par le cycle de Krebs à la lumière (Padmasree et Raghavendra, 2000 ; Siedow et Day, 2000). Par exemple, la PDC (pyruvate décarboxylase) et la PDH (pyruvate déshydrogénase) mitochondriales, mais également l'enzyme malique à NAD, enzymes majeures déterminant le flux de carbone dans le cycle de Krebs, sont inhibées à la lumière (Krömer, 1995; Hoefnagel et al., 1998; Atkin et al., 1998; Tovar-Mendez et al., 2003). Tcherkez et al. (2005) ont identifié, par des méthodes utilisant les isotopes stables du carbone et la résonance magnétique nucléaire, les principales étapes de la respiration foliaire inhibées à la lumière comme étant l'entrée des hexoses dans la glycolyse et le cycle de Krebs. En effet, en apportant à des feuilles attachées de haricot du glucose ou du pyruvate enrichis en ^{13}C à différentes positions et en étudiant la production de

$^{13}\text{CO}_2$ à la lumière, ils ont montré *in vivo* qu'à la lumière, le cycle de Krebs est réduit de 95% et la pyruvate déshydrogénase de 27% (Tcherkez et al., 2005).

De plus, un pool plus important en NADH et/ou NADPH mitochondrial peut réduire l'activité du cycle de Krebs via un rétrocontrôle négatif des produits et une inhibition des déshydrogénases (Krömer, 1995) et de cette façon amener à la réduction du dégagement de CO_2 . Le métabolisme photorespiratoire peut constituer une source supplémentaire en NADH dans les mitochondries. Un rapport NADPH/NADP compris entre 1 et 3 a été atteint chez le pois *Pisum sativum* à la lumière (contre 0,2 à l'obscurité), ce qui inhibe la NADP-isocitrate déshydrogénase mitochondriale (Igamberdiev et Gardeström, 2003).

Enfin, peuvent également contribuer à la diminution du dégagement de CO_2 (i) les biosynthèses ayant lieu à la lumière et utilisant les intermédiaires du métabolisme respiratoire (notamment de l'acétyl coA pour la synthèse d'acides gras et d'isoprénoïdes; Bao et al., 2000) et (ii) le déroulement du métabolisme azoté (par l'export d'intermédiaires du cycle de Krebs).

II. VII.2 Comment mesurer R_d

Différentes possibilités sont connues pour estimer la fraction de dégagement de CO_2 qui persiste à la lumière en mesurant les échanges gazeux foliaires.

La première méthode, suggérée par **Kok en 1948** utilise le changement de pente de la courbe de réponse de la photosynthèse à la lumière incidente pour de faibles intensités lumineuses (désignés sous le terme de 'Kok effect').

D'autres approches sont basées sur les propriétés des courbes de réponse de l'assimilation nette de CO_2 à la concentration intercellulaire en CO_2 (c_i : courbes A_n-c_i). Pour de faibles c_i , les courbes A_n-c_i peuvent être caractérisées par leur point d'intersection avec l'axe des abscisses (Γ , point de compensation pour le CO_2) et leur pente initiale (sa valeur inverse r_i , résistance interne à la fixation de CO_2 , consistant en une composante de diffusion, r_m , résistance au transfert du CO_2 dans le mésophylle, et une composante liée à la carboxylation, r_c).

Selon la méthode proposée par **Laisk (1977 ; Brooks and Farquhar, 1985)**, la respiration mitochondriale à la lumière (R_d , Farquhar et von Caemmerer, 1982) est obtenue comme étant l'ordonnée du point d'intersection entre les courbes A_n-c_i mesurée à au moins deux intensités lumineuses incidentes. L'abscisse de ce point indique la concentration intercellulaire en CO_2 ,

c^* , pour laquelle l'assimilation nette est égale à la respiration à la lumière R_d (**figure 12A**). Ces deux paramètres R_d et c^* peuvent être obtenus via une méthode alternative proposée par Peisker à partir de la régression linéaire entre Γ et le produit $R_n \cdot r_i$, nécessitant toutefois un champ de variation important de valeurs de Γ (Peisker, 1978 ; Peisker et Apel, 1980).

Selon Laisk, c^* est considérée comme une estimation *in vivo* du point de compensation Γ^* , correspondant à Γ en l'absence de respiration mitochondriale, c'est-à-dire seulement donné par la concentration en O_2 et le facteur de spécificité $S_{c/o}$ de la Rubisco. Toutefois, c^* est dérivé indirectement de la concentration intercellulaire en CO_2 et non de la concentration chloroplastique en CO_2 (c_c). Il en résulte que c^* pourrait sous-estimer Γ^* (von Caemmerer et al., 1994 ; von Caemmerer, 2000, **figure 12B**).

II.VIII Echanges d'énergie et de pouvoir réducteur

L'interaction mitochondrie-chloroplaste dépend notamment de l'échange de métabolites tels que l'ATP (énergie), les équivalents réduits NADH et NADPH (pouvoir réducteur) ou les squelettes carbonés (comme substrats). Ces échanges intercompartimentaux impliquent également le cytosol (Krömer, 1995 ; Hoefnagel et al., 1998 et Dutilleul, 2003). Ils mettent en jeu de nombreux translocateurs spécifiques et/ou navettes métaboliques (tels que les translocateurs ATP/ADP ou la navette oxaloacétate/malate présents dans les membranes mitochondriales et chloroplastiques). Le cycle photorespiratoire intervient également dans l'échange de pouvoir réducteur, et plus particulièrement de NADH lors de la conversion de la glycine en sérine dans les mitochondries. Ce NADH produit peut participer à la réduction du nitrate dans le cytosol, être oxydé au niveau de la chaîne respiratoire pour la synthèse d'ATP, ou participé dans les péroxysomes à la réduction de l'hydroxypyruvate à partir de la sérine.

Concernant les échanges de composés carbonés, les chloroplastes exportent du carbone via le translocateur phosphate : la concentration en P_i cytosolique détermine si le dihydroxyacétone-3-phosphate reste dans le chloroplaste pour y être converti en amidon, ou s'il est exporté dans le cytosol pour servir de substrat à la synthèse de saccharose, de malate ou de pyruvate (Hoefnagel et al., 1998, Krömer, 1995). Les mitochondries possèdent des translocateurs spécifiques d'acides organiques pour la plupart des intermédiaires du cycle de Krebs: les navettes oxaloacétate/malate, malate/citrate, mais également un transporteur de dicarboxylate qui catalyse les échanges de malate/ P_i (Hoefnagel et al., 1998).

II.IX Acclimatation des plantes à l'intensité lumineuse de croissance

II.IX.1 Définitions

Les organismes photosynthétiques rencontrent continuellement des fluctuations de l'environnement, particulièrement en terme de quantité de lumière incidente (canopée, nuages, saisons). L'acclimatation consistera pour la plante à optimiser l'équilibre entre l'absorption de la lumière et son utilisation pour les réactions primaires et secondaires de la photosynthèse. Ainsi, **l'acclimatation** peut être définie comme la régulation du métabolisme et de la photosynthèse aux conditions de l'environnement par plasticité phénotypique, par opposition à l'adaptation.

II.IX.2 Phénoménologie morpho-anatomique et cytologique

L'acclimatation à l'intensité lumineuse est communément suivie via deux paramètres faciles à mesurer et caractérisant à la fois la structure de la feuille et le fonctionnement de l'appareil photosynthétique : le contenu en chlorophylles et plus particulièrement le rapport chlorophylles a/b et la photosynthèse maximale.

Moins de 5% de l'énergie provenant du Soleil arrivant au sol, est convertie en carbohydrates par une feuille photosynthétisante. La raison principale de ce très faible rendement est que la plus grande partie de la lumière incidente présente des longueurs d'ondes non absorbées par les pigments photosynthétiques (ce qui représente une perte de 60%). De plus, une partie est réfléchiée (8% de l'énergie incidente totale). Une partie non négligeable est ensuite perdue sous forme de chaleur (8%) et une autre utilisée pour le métabolisme (19%).

Du fait de leur absence de mobilité, les plantes ont développé de nombreux mécanismes pour s'accommoder de ces différents niveaux de lumière, comme une capture efficace de la lumière en condition limitante, ou empêcher les dommages potentiels dus aux effets de la lumière en excès. Un exemple frappant d'acclimatation au niveau d'éclairement incident concerne les arbres, avec les feuilles de la canopée, dites de lumière, et les feuilles de l'intérieur du couvert, dites d'ombre. Ces feuilles présentent des structures très différentes: les feuilles de lumière sont plus épaisses, possèdent des cellules plus compactes et renferment

plus de chlorophylles par unité de surface. Elles présentent un taux de respiration plus élevé leur conférant un coût énergétique de maintenance plus élevé qui ne leur permettrait pas d'être efficaces à l'ombre.

Les plantes peuvent donc s'acclimater à différents niveaux, de la plante entière au niveau foliaire, voire cellulaire. Ces différentes stratégies, que ce soit l'acclimatation à faible ou forte lumière, correspondent à une homéostasie photosynthétique. En effet, l'étude des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne, tels que le rendement quantique du photosystème II et le quenching photochimique (ϕ_{PSII} et qP, voir Matériel et Méthodes), montrent qu'une plante tend à optimiser, parmi les photons absorbés par le PS II, la part utilisée pour la photochimie, et à maintenir le PS II à l'état oxydé (Bailey et al., 2004).

On distingue sous l'effet d'une augmentation/diminution de la lumière incidente de croissance, des changements au niveau (Bailey et al., 2001, 2004 ; Evans et Poorter, 2001) :

- **de la plante entière:** l'augmentation de la lumière incidente induit une augmentation de la vitesse de croissance de la plante ainsi qu'une diminution de la fraction de biomasse allouée aux feuilles au profit de celle allouée aux racines. Ceci est mis en parallèle avec le maintien d'une transpiration constante par unité de masse racinaire, ou avec une plus grande demande en nutriments nécessaire à une croissance plus rapide sous fortes intensités lumineuses (une croissance plus lente a été observée chez des plantes transgéniques présentant des niveaux ou activités réduits en cytochrome b_6f (Price et al., 1998) ou Rubisco (Quick et al., 1991));
- **de la feuille:** des changements au niveau du SLA ('Specific Leaf Area', surface foliaire projetée par unité de masse sèche foliaire) interviennent. Les plantes cultivées sous de fortes intensités lumineuses ont généralement des feuilles plus épaisses avec un faible SLA, du fait en partie de couches supplémentaires de parenchyme palissadique ou de cellules du parenchyme palissadique plus grandes (*figure 10C*). Cela augmente le nombre de chloroplastes par unité de surface et la quantité d'enzymes photosynthétiques, favorisant par conséquent la capacité photosynthétique par unité de surface foliaire (Murchie et Horton, 1997);
- **de la cellule:** une réallocation de l'azote entre les différents pools participant à la photosynthèse est généralement observée. Les plantes cultivées sous de fortes intensités lumineuses, par rapport à des plantes cultivées sous de faibles intensités lumineuses,

ont (1) moins de chlorophylle par unité d'azote, (2) un rapport chlorophylle a/b plus élevé, comme chez le pois (Leong et Anderson, 1984a), *Arabidopsis*, l'épinard ou l'orge (de la Torre et Burkey, 1990a, 1990b), (3) une capacité de transport des électrons supérieure par unité de chlorophylle ou de surface (Powles, 1984 ; de la Torre et Burkey, 1990b), (4) une assimilation nette de CO₂ à lumière saturante et par unité de surface supérieure (**figure 10A, 10B**) et (5) une quantité (cyt b₆f, Rubisco) et/ou activité (ATPase) supérieures de certaines protéines par unité de surface (Stitt, 1986 ; Seeman et al., 1987). L'augmentation du rapport chlorophylles a/b communément observée est cohérente avec une diminution de la taille des antennes collectrices du PS II (diminution du contenu en LHCII, où les chlorophylles b sont principalement localisées). Cette diminution de taille réduirait l'absorption de lumière ainsi que la distance antenne-centre, réduisant les possibilités de dé-excitation des photons ou leur réémission sous forme de fluorescence. Le quenching non photochimique (dé-excitation de la chlorophylle sous forme de chaleur) peut être plus important chez des plantes placées sous fort éclairage afin de limiter les effets néfastes de l'absorption d'un excès de lumière, non utilisé par la plante pour la photochimie. La réduction du nombre de chlorophylles associées à chaque photosystème aurait un rôle photoprotecteur, les plantes cultivées ou soumises à de forts éclairages étant moins sensibles vis à vis de la photoinhibition que les plantes soumises à de faibles éclairages incidents (Park et al., 1996 ; Savitch et al., 2000). Au niveau chloroplastique, on distingue les réponses à **court terme** (de quelques secondes à quelques minutes, par réarrangements de la structure et/ou de la fonction de composés chloroplastiques via la régulation de l'activité du PS II, le changement de l'état d'activation de la Rubisco ; Horton et al., 1996, Salvucci et Ögren, 1996), et des réponses à **long terme** (synthèse/dégradation de constituants chloroplastiques modulant la composition et la fonction de l'appareil photosynthétique ; pour revue Anderson et al., 1995). Certaines plantes d'ombre ont des rapports centres réactionnels PS II/PS I de 3, contre 2 pour les plantes de lumière (Anderson, 1986), tendant à améliorer l'absorption de lumière et le transfert d'énergie dans des environnements ombragés où la lumière rouge sombre est plus abondante.

Toutefois, quelques exceptions ont été observées, avec une absence de changement du rapport chlorophylles a/b chez *Tradescantia albiflora* (Chow et al., 1991) et une augmentation de l'assimilation nette maximale chez *Castanospermum australe* cultivé sous faible lumière et non sous forte lumière (Anderson et Osmond, 1987).

II.IX.3 Déterminisme

Walters écrit en 2003 que malgré une bonne caractérisation de l'acclimatation en terme de composition et de fonction de l'appareil photosynthétique, peu de choses sont connues quant aux mécanismes par lesquels elle est régulée (Walters et al., 2003).

La plupart des composants de l'appareil photosynthétique comprennent des sous-unités codées par le génome chloroplastique et d'autres par le génome nucléaire (exemple de la Rubisco). L'acclimatation pourrait supposer dès lors une coordination de l'expression de ces gènes et donc une interaction entre différents compartiments cellulaires. La question se pose quant aux signaux impliqués dans ce processus d'acclimatation. Il a été montré que certains facteurs environnementaux (dont la lumière ou la température) ou le contenu en sucres pouvaient réguler l'expression de gènes codant pour des composants chloroplastiques (Anderson et al., 1995 ; Pfannschmidt et al., 1999-2000 ; Oswald et al., 2001 ; Rolland et al., 2002).

L'acclimatation implique potentiellement de multiples chaînes de transduction de signaux, avec des dialogues entre contrôle redox et autres voies contrôlant l'expression de gènes photosynthétiques, la traduction de transcrits chloroplastiques et nucléaires ou l'importation de protéines à l'intérieur des chloroplastes (Walters, 1999 ; Pfannschmidt et al., 2001 et 2003 ; Pfannschmidt, 2003). L'importance de l'état rédox de la chaîne de transport des électrons chloroplastiques et plus généralement des signaux rédox reliés à la photosynthèse pour la signalisation impliquée dans l'acclimatation a été montrée chez des organismes photosynthétiques unicellulaires tels que *Chlamydomonas* (tels que le pool de plastoquinones, premiers accepteurs des électrons du PS II, et le cytochrome b_6f : Maxwell et al., 1994 ; Escoubas et al., 1995 ; Durnford et Falkowski, 1997 ; Huner et al., 1998 ; Pfannschmidt et al., 1999 et 2001a ; Im et Grossman, 2002 ; Pfannschmidt, 2003). De récents travaux vont dans ce sens : Pursiheimo et al. 2001 ont par exemple montré que les signaux rédox des plastoquinones co-régulent avec les thiorédoxines l'activité d'une LHCI kinase. Toutefois, l'état rédox du pool de plastoquinones semble insuffisant pour rendre compte de l'ensemble des réponses d'acclimatation des plantes, un même changement de cet état rédox amenant des réponses d'acclimatation différentes (Walters et al., 1999 ; Pfannschmidt et al., 1999 ; Bailey et al., 2001). L'implication d'autres signaux a donc été envisagée, dont le rapport ATP/ADP, les phytochromes et cryptochromes (Walters et al., 1999), les carbohydrates et sucres en particulier (Rolland et al., 2002). Tous ces paramètres sont impliqués dans l'expression des gènes codant pour des composants de l'appareil photosynthétique.

III. Impacts et réponses des plantes au stress

III.I Généralités sur les Formes Activées de l'Oxygène

La capacité des tissus photosynthétiques à convertir la lumière absorbée en énergie chimique est accompagnée de la formation d'espèces activées de l'oxygène, ou FAO (*figure 13*). Chez les plantes supérieures, ces FAO sont les produits de nombreux processus métaboliques impliquant des réactions d'oxydoréduction. Les processus de transfert des électrons de la photosynthèse (au niveau chloroplastique ; source majeure des FAO chez les plantes, Asada et Takahashi, 1987) et de la respiration (au niveau mitochondrial, considéré comme un site mineur de production de FAO chez les végétaux, Møller, 2001), ainsi que la phosphorylation oxydative, la photorespiration et la β -oxydation des acides gras, sont en particulier connus pour générer des FAO (pour revue, voir Foyer, 1997 et Niyogi, 1999). Les principaux lieux de production potentiels de FAO sont illustrés au niveau de la *figure 14*. D'autres mécanismes tels que la polymérisation de la lignine dans les parois ou encore la β -oxydation dans les glyoxysomes participent également à la production de FAO chez les plantes. Les FAO produites, présentées *figure 13*, sont principalement l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, l'ion superoxyde O_2^- (réaction de Mehler) et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . L' H_2O_2 , mais également les ions O_2^- , semblent jouer un rôle important en terme de signalisation cellulaire en tant que second messager (Neill et al., 2002). Cependant, une production excessive de FAO présentera des effets néfastes sur le développement et la survie de la plante lorsque celles-ci ne sont pas détoxifiées, c'est le stress oxydant. En effet, si l' H_2O_2 et les ions O_2^- sont toxiques par eux-mêmes, ils peuvent initier des cascades de réactions produisant le radical hydroxyl ($\text{HO}\cdot$, réactions d'Haber-Weiss, *figure 13*), espèce la plus réactive exerçant des effets toxiques dans tous les compartiments cellulaires via la peroxydation des lipides, la dégradation/modification des protéines, ainsi que des dommages au niveau de l'ADN (Alscher et al., 1997).

Parmi les stress dits oxydants, les fortes intensités lumineuses et l'utilisation d'herbicides tels que le méthylviologène (ou paraquat) en sont des exemples typiques. Le froid est également très souvent associé à ce type de stress photooxydants (Wise, 1995).

III.I.1 Effets de fortes intensités lumineuses

Les plantes sont constamment « en danger » en absorbant plus d'énergie lumineuse qu'elles ne peuvent en utiliser pour leur métabolisme. Quand l'énergie lumineuse absorbée excède la capacité du cycle CBB, un excès de pouvoir réducteur peut être formé. Cet excès d'énergie

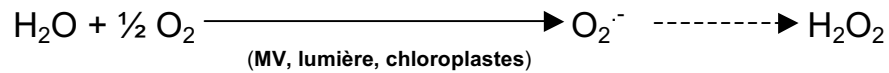
peut être dévié vers la réduction de l'O₂ moléculaire au sein de la chaîne photosynthétique de transfert des électrons provisoirement saturée, à l'origine de la production d'ions O₂⁻ au niveau du photosystème I (PS I). D'autre part, lorsque cette chaîne photosynthétique est réduite, la dé-excitation de la chlorophylle vers la voie photochimique est bloquée et la probabilité d'un changement de spin augmente, favorisant la formation de chlorophylle triplet. Le retour de cette chlorophylle triplet à l'état singulet non excité se fait en transférant l'énergie d'excitation aux caroténoïdes et à l'oxygène triplet (forme de l'O₂ moléculaire) amenant à la formation de l'¹O₂ au niveau du photosystème II (PS II). L'énergie emmagasinée au sein des caroténoïdes est libérée sous forme de chaleur.

Dans ces conditions, les centres réactionnels des PS II sont inactivés et endommagés, phénomène appelé **photoinhibition**. Des études biochimiques ont montré que la sur-réduction du PS II peut être une source importante de FAO dans les cellules photosynthétiques (Willekens et al., 1997). Sous l'effet d'un excès modéré de lumière, le rendement quantique maximum de la photosynthèse (pente de la partie linéaire de la courbe photosynthèse-lumière, estimé via la fluorescence chlorophyllienne : F_v/F_m , voir Matériel et Méthodes) est diminué du fait de la diversion d'une partie de l'énergie lumineuse absorbée vers la dissipation sous forme de chaleur, mais l'assimilation nette maximale peut rester inchangée. Lors de l'exposition à de très forts excès de lumière, l'appareil photosynthétique peut être endommagé et à la fois le rendement quantique maximum de la photosynthèse et l'assimilation nette maximale peuvent être diminués (Powles, 1984). Cette photoinhibition est principalement associée à l'inactivation de la protéine D1, protéine majeure des centres réactionnels des PS II et à une dépression soutenue de l'efficacité photosynthétique. Elle se traduit généralement par une baisse durable du rendement quantique optimal du PS II (ϕ_{PSII}) et donc du rendement quantique de l'assimilation du CO₂ (ϕ_{CO_2}), pouvant être suivie d'une diminution de la capacité photosynthétique A_{max} (Powles, 1984) et d'une dégradation et/ou un non renouvellement de la protéine D1 (Kettunen et al., 1991, pour revue Aro et al., 1993) et de la catalase peroxysomale (Feierabend et al., 1992). Il est intéressant de noter que des plantes déficientes en catalase peuvent présenter de graves lésions sur leurs feuilles sous forte lumière (Willekens et al., 1997), suggérant un rôle important de cette enzyme dans la réponse aux stress oxydants.

III.1.2 Le méthylviologène (MV)

Les composés dérivés du méthylviologène ont été utilisés en agronomie comme herbicides et sont typiquement utilisés en recherche pour induire, en présence de lumière, un stress oxydant

en provoquant une surproduction de FAO à l'intérieur du chloroplaste (Dodge, 1994). Le méthylviologène, MV, agit sur le système photosynthétique, en acceptant les électrons issus du PS I, ce qui augmente le transport électronique. Ainsi réduit, le MV détourne les électrons vers l'O₂ moléculaire pour induire la formation d'ions O₂⁻ (**figure 15**, Lorenzini et al., 2002). D'autres FAO telles que le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyl peuvent dès lors être générées (Schmitz-Eiberger et al., 2001).



L'une des principales caractéristiques de l'action d'herbicides de ce type est un potentiel redox négatif, approprié pour interagir avec le côté réducteur du PS I, et une capacité d'auto-oxydation par l'O₂ moléculaire. Le MV est réduit à partir du centre FeS_B principalement, et son accrochage au thylakoïde est facilité par sa nature dicationique. Des études réalisées avec des herbicides de type bipyridinium ont indiqué que leur action est favorisée par l'O₂ et la lumière (Mees, 1960), et que le MV réduit réagissait avec l'O₂ avec une constante de vitesse de 7,7 10⁻⁸ M⁻¹ s⁻¹ (Farrington et al., 1973). La diversion du flux électronique causé par ces composés bipyridiniums empêche de plus la réduction du NADP⁺, qui intervient en aval du PS I. Cela conduit à la diminution de la fixation de CO₂ (Harris et Dodge, 1972), ce qui est renforcé par l'effet de l'H₂O₂ sur certaines enzymes du cycle CBB telles que la fructose-1,6-bisphosphatase et la sédoheptulose-1,7-bisphosphatase (Kaiser, 1979 ; Heldt et al., 1978). Le NADPH est également requis pour le maintien du cycle ascorbate-glutathion via la glutathion reductase et la NADPH-monodéhydroascorbate réductase (Asada et Takahashi, 1987).

III.1.3 Le froid

Les basses températures ralentissent les réactions enzymatiques, modifient la constitution des lipides ou d'autres molécules. L'étude de mutants d'*Arabidopsis thaliana* dont la synthèse de sucres a été altérée (augmentée ou diminuée) montre une très forte corrélation entre les teneurs en saccharose et le niveau de tolérance au gel (Guy et al., 1992 ; Gilmour et al., 2000). Toutefois, une synthèse trop importante de saccharose consomme les intermédiaires phosphorylés du cycle CBB et inhibe la régénération du ribulose-1,5-bisphosphate. A l'inverse, une synthèse de saccharose insuffisante mène à une accumulation de ces intermédiaires phosphorylés et à l'appauvrissement en Pi, ce qui se traduit par une inhibition de la synthèse d'ATP et une inactivation de la Rubisco, d'où une baisse de l'assimilation de CO₂ observée

communément à basse température. Lorsque *Arabidopsis thaliana* est soumis à une période d'acclimatation au froid, une séquence d'événements vise à limiter les effets négatifs du froid : le transfert des plantes de 23°C à 5°C provoque en 30 minutes l'activation de la saccharose phosphate synthase (SPS) puis dans les jours suivants, la synthèse de saccharose est stimulée par augmentation de l'expression de certaines enzymes et modification de la répartition cellulaire du Pi, qui se déplace de la vacuole vers le cytoplasme (Hurry et al., 2000). Outre l'augmentation des niveaux en sucres, l'acclimatation aux basses températures induit l'accumulation de proline et d'autres cryoprotecteurs tels que la glycyl-bétaïne chez certaines espèces (Gilmour et al., 2000) ainsi que la désaturation accrue des lipides visant à restaurer la fluidité des membranes et les niveaux en antioxydants. L'expression de certains gènes régulés par le froid peut être favorisée: par exemple, c'est le cas pour le gène COR15a, codant pour une protéine interagissant avec des lipides de l'enveloppe chloroplastique pour maintenir une fonction membranaire pendant les cycles de gel (Seki et al., 2001). Parmi les adaptations morphologiques, les plantes de climats alpins voire arctiques ont notamment développé des mécanismes limitant les pertes de chaleur par convection (vent). Nous pouvons citer la présence de poils et la forme de port en coussinet chez certaines Saxifrages et Androsaces.

III.II Réponses des plantes à ces contraintes

Différents moyens efficaces pour empêcher et/ou se protéger des dommages photooxydants coexistent chez les plantes, aussi bien à l'échelle d'un organe tel que le chloroplaste, d'une cellule ou d'un organisme. Les mécanismes mis en jeu interviennent aussi bien en amont qu'en aval de la collecte de la lumière afin de minimiser la formation de FAO, de les détoxifier ou de réparer les dommages causés.

III.II.1 Mécanismes limitant l'incidence et/ou l'absorption de lumière

L'une des principales causes d'un déséquilibre entre la fourniture d'énergie et les besoins métaboliques est l'exposition de la plante à de très fortes intensités lumineuses. Les mécanismes limitant l'incidence et l'absorption de la lumière vont de changements morphologiques (par la présence d'une pilosité abondante, la réorientation et le mouvement des feuilles et des chloroplastes en position parallèle à la lumière incidente) à des modifications au niveau des antennes collectrices de lumière associées aux photosystèmes (changements de la taille des antennes par des phénomènes de transition d'état des antennes,

ou des changements de l'expression de gènes de protéines CAB, chlorophyll a/b binding protéines, constituants protéiques des LHC; Escoubas et al., 1995 ; Maxwell et al., 1995). Une réduction du pool de plastoquinones, intervenant sous de fortes intensités lumineuses incidentes lorsque la chaîne photosynthétique de transfert des électrons est saturée, active une kinase capable de phosphoryler les complexes associés aux antennes du PS II. Ces LHC phosphorylés se détachent du PS II, diminuant de ce fait la taille des antennes collectrices, et migrent vers le PS I (pour revue, Wollman, 2001). Ce mécanisme participerait au quenching non photochimique de la fluorescence (Müller et al., 2001) et permettrait une redistribution de l'énergie lumineuse vers le PS I. La production d'ATP via le transfert cyclique des électrons autour du PS I serait ainsi maintenue, cet ATP pouvant alors participer aux mécanismes de réparation des éventuels dommages causés notamment aux constituants du PS II (Finazzi et al., 2001), et plus particulièrement à la protéine D1, celle-ci étant, nous l'avons vu précédemment, une cible précoce d'un excès lumineux. Toutefois, l'implication de ces LHCI phosphorylés dans ces réponses de défense à un stress lumineux est remise en question par des travaux récents montrant que si la plupart des protéines LHCI sont phosphorylées sous faible éclairage, la kinase responsable de leur phosphorylation est inhibée pour des intensités lumineuses incidentes modérées (Aro et al., 2005).

III.II.2 Mécanismes consommant l'énergie en excès

De nombreux mécanismes peuvent consommer de l'énergie: la réaction de Mehler, la photorespiration, la chlororespiration, l'assimilation (CO₂, azote, soufre), les réactions de réductions, la production de FAO et le métabolisme lipidique.

En effet, une plante peut par exemple augmenter sa capacité d'assimilation du carbone comme puits pour l'énergie incidente (exemple du blé adapté au froid présentant une activité spécifique de Fructose-1,6-bisphosphatase et de Saccharose Phosphate Synthase (SPS) deux fois supérieures à celles de variétés printanières : Hurry et al., 1995).

Au contraire, une plante peut minimiser la part allouée à la photochimie, principale source de FAO et donc de dommages oxydatifs potentiels. Elle présente pour cela tout un panel de mécanismes (voir pour une revue Niyogi, 1999 et 2000) allant de la dissipation thermique (quenching non photochimique), ou au niveau mitochondrial, à l'activation des voies alternes de la chaîne respiratoire (AOX et NAD(P)H déshydrogénases, diminuant le flux d'électrons

au niveau des complexes I, II et III responsables de la production de FAO au niveau mitochondrial, Braidot et al., 1999 ; Møller, 2001), voire au déroutage du flux d'O₂ vers la chlororespiration (assurant une réoxydation du pool des quinones via la PTOX), la photorespiration ou la réaction de Mehler (constituant via l'O₂ comme accepteur des électrons du PS I, un puits pour le pouvoir réducteur, Wise, 1995 et Niyogi, 1999 et 2000). Le mécanisme moléculaire du quenching non photochimique n'est pas encore élucidé mais le pH du lumen et l'état d'agrégation des complexes antennes sont importants. Trois caroténoïdes, appelés **xanthophylles** sont impliqués : la violaxanthine, l'anthéroxanthine et la zéaxanthine. Sous forte lumière, le flux linéaire de transfert des électrons au niveau de la chaîne chloroplastique augmente, avec pour conséquence un transfert important de protons du stroma vers le lumen. Cette baisse du pH du lumen diminue la solubilité de l'enzyme violaxanthine dé-époxydase. L'enzyme vient alors s'accrocher au niveau des membranes thylakoïdiennes pour y catalyser la déépoxydation de la violaxanthine en zéaxanthine (*figure 16* ; Horton et al., 1996). Quand l'intensité lumineuse diminue, ce processus est inversé. L'accrochage de protons et de zéaxanthine aux protéines antennes collectrices de lumière est connu pour induire des changements de conformation qui mènent au quenching et à la dissipation thermique (*figure 16*; Demmig-Adams et Adams, 1992-1996 ; Horton et al., 1996).

La plante dispose de diverses possibilités pour dissiper la chaleur souvent associée aux forts éclaircissements. On peut citer l'émission de radiations aux grandes longueurs d'ondes, l'évaporation de l'eau contenue à l'intérieur des feuilles. La synthèse de composés tels que les isoprènes peut également jouer un rôle dans la thermotolérance de l'appareil photosynthétique, de la plante, ou de l'arbre (Sharkey et Singaas 1995 ; Sharkey et al., 2001).

III.II.3 Systèmes 'antioxydants' de protection vis à vis des FAO

Les moyens de défense contre les FAO développés par la plante font intervenir des antioxydants : les caroténoïdes, l' α -tocophérol, les xanthophylles, l'ascorbate et le glutathion.

Les caroténoïdes agissent en désactivant l'énergie d'excitation de l'¹O₂ produit au niveau du PS II; Foyer, 1997 et Niyogi, 1999). **L' α -tocophérol** est quant à lui un antioxydant lipophile permettant de stopper la formation de peroxydes lipidiques dans les membranes thylakoïdiennes, qui, une fois oxydé en α -chromanoxyl, est régénéré par l'action de l'ascorbate;

Polle, 1997). **L'ascorbate** présente un rôle central dans de nombreux processus incluant (i) la désactivation de l' $^1\text{O}_2$, (ii) la réduction des ions O_2^- , (iii) la détoxification de l' H_2O_2 , (iv) la conversion de la violaxanthine en zéaxanthine dans le cycle des xanthophylles, et (v) dans le recyclage de l' α -tocophérol (Polle, 1997 et Foyer, 1997). Enfin, **le glutathion** a un rôle de protection principalement des protéines à groupements thiols ainsi que de réducteur pour le recyclage de l'ascorbate (Polle, 1997 et Foyer, 1997).

Il existe de plus des enzymes antioxydantes telles que les **enzymes du cycle ascorbate-glutathion** (impliquées dans le recyclage des pools d'ascorbate et de glutathion, *figure 17*), les différentes isoformes de **superoxyde dismutase** SOD: catalysant la formation d' H_2O_2 à partir d'ions O_2^- dans les mitochondries: MnSOD, les chloroplastes: FeSOD et le cytosol: Cu/ZnSOD) et la **catalase** (*figure 14*). La catalase est une enzyme tétramérique contenant quatre groupes hème (pour revue, Deisseroth et Dounce, 1970). Elle est synthétisée dans le cytoplasme et adressée sous sa forme oligomérique au peroxyosome. Les deux gènes *Cat1* et *Cat2*, isoformes respectives CAT1 et CAT2 de la catalase sont exprimés dans les feuilles matures. CAT1 représenterait environ 80% de l'activité catalase des feuilles et serait localisée dans les cellules du parenchyme palissadique. CAT2 représenterait environ 20% et se trouve dans le phloème. La lumière induit la synthèse du groupement hème dans le chloroplaste alimentant le pool hème lié aux membranes (Feierabend et al., 1996) qui pourrait être utilisable pour la synthèse de catalase. Toutefois, la forte lumière induit une inactivation de la catalase dans le peroxyosome et sa dépolymérisation. Les groupes hèmes issus de cette dégradation seraient recyclés par le pool libre lié aux membranes. Des études ont montré que le niveau de catalase maintenu dans les feuilles matures est indispensable pour rétablir la balance redox durant les stress oxydants et reflétait un équilibre entre une constante photoinhibition aboutissant à sa dégradation et une constante synthèse de la protéine. Certaines conditions de stress telles que la forte lumière, et le stress salin qui favorisent la dégradation, peuvent entraîner une surcharge de la capacité de synthèse compensatrice de la catalase et l'inhiber.

III.II.4 Systèmes de réparation des dommages causés par les FAO

Les systèmes mis en jeu pour répondre aux dommages causés par les FAO sont spécifiques aux cibles de ces dommages. Concernant les lipides, la plante possède des Glutathion Peroxydases mais dont l'activité est très faible dans les chloroplastes (Nakano et Asada, 1981). Pour répondre aux dommages causés aux protéines peuvent intervenir la réduction des ponts

disulfures (Møller, 2001) ou la synthèse rapide de nouvelles protéines afin de remplacer les protéines dégradées. Un mécanisme très important de réparation des dommages causés au PS II consiste en un turnover très organisé, régulé et compartimenté dans les membranes thylakoïdiennes de la protéine D1 (pour revue, Aro et al., 1993; Long et al., 1994). Enfin, lorsque les dommages affectent l'ADN, il peut y avoir excision des séquences mutées.

Malgré cette multiplicité de systèmes de protection, les plantes ne peuvent éviter certains dommages radiatifs photooxydants (Millar et al., 2001): le centre réactionnel (protéine D1) du PS II (Aro et al., 1993), et la catalase peroxysomale (Feierabend et al., 1992) sont inactivés de façon lumière dépendante. Comme cela a été mentionné, différents stress environnementaux tels que le froid, la forte lumière, les polluants ou certains herbicides utilisés en agriculture sont connus pour induire chez les végétaux un état de stress oxydant, dont les effets provenant principalement d'une accumulation de FAO, se manifestent dans tous les compartiments cellulaires. L'inactivation de la catalase et de la protéine D1 constituent des indicateurs significatifs précoces des réponses des plantes à ce type de stress (Streb et al., 1993).

Si nos connaissances sur le stress oxydant et les défenses antioxydantes proviennent surtout de travaux réalisés sur les chloroplastes et les péroxysomes, un intérêt croissant est porté aux mitochondries. 1 à 2% de l'O₂ réduit par la mitochondrie au niveau de la chaîne respiratoire est converti en ions O₂⁻ à des étapes différentes de la chaîne respiratoire : en amont de l'ubiquinone au niveau des complexes I et II (Braidot et al., 1999). Sous certaines conditions, la production de FAO croît (présence de l'ion calcium ou mécanismes de défense insuffisants) et provoque des dommages irréversibles à l'ADN mitochondrial, aux lipides membranaires et aux protéines. Il s'ensuit alors un dysfonctionnement mitochondrial qui conduit à la mort de la cellule. Il a été démontré chez les animaux, chez lesquels les mitochondries constituent une source majeure de FAO, que les dommages oxydatifs mitochondriaux résultant de stress oxydants, participaient au mécanisme de mort cellulaire programmée ou accidentelle (Pedersen, 1999). Des études réalisées chez les plantes via des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale vont également dans le sens d'une implication des mitochondries dans les réponses à un stress oxydant (Maxwell et al., 1999): des résultats récents obtenus sur le mutant CMSII de *Nicotiana glauca* ont suggéré l'implication d'une signalisation entre l'ensemble des compartiments cellulaires (mitochondries, chloroplastes, noyaux, peroxysomes et cytosol) dans la réponse à une protéine élicitrice bactérienne, la harpine (Garmier et al., 2003) et au VMT (Dutilleul et al. 2003b).

IV. Objectifs de l'étude

Mon travail de thèse, basé sur l'étude du mutant mitochondrial CMSII de *Nicotiana sylvestris* a consisté en la caractérisation des réponses de ce mutant à différentes conditions environnementales telles que l'intensité lumineuse de croissance ou une exposition à une contrainte (de type forte lumière associée ou non au froid ou à un herbicide, le méthylviologène); ceci afin de répondre aux interrogations suivantes :

- (1) le mutant CMSII présentant en conditions ambiantes (CO₂, O₂, température) et sous différentes intensités lumineuses une assimilation carbonée inférieure de l'ordre de 30% à celle du sauvage, existe-t-il des conditions de culture pour lesquelles cette différence est exacerbée ou au contraire minimisée ? Est-t-il possible dès lors d'identifier le niveau auquel ce mutant serait affecté afin de lier l'absence de complexe I fonctionnel à la plus faible assimilation carbonée et ainsi progresser dans la connaissance des interactions mitochondries-chloroplastes ?
- (2) Le mutant CMSII présente de façon constitutive des activités et niveaux de transcrits de certaines enzymes antioxydantes, telles que l'ascorbate peroxydase (Dutilleul et al., 2003b) plus élevés que le sauvage. Sa résistance à différents types de stress tels que l'ozone, le virus de la mosaïque du tabac a été démontrée (Dutilleul et al., 2003b). De plus, si la principale fonction de la mitochondrie est l'apport en énergie pour la cellule, directement utilisable sous forme d'ATP, de nombreuses autres fonctions sont envisagées, dont une très forte majorité impliquerait des FAO. Quelles seraient donc les conséquences de l'application d'un stress oxydant (induit ici par le méthylviologène) et d'une contrainte associant ou non le froid à de forts éclairagements *in vivo* chez ce mutant mitochondrial de tabac ? En outre, quel serait l'impact d'une croissance de ces plantes à deux intensités lumineuses incidentes, 80 et 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, l'acclimatation à différents niveaux d'éclairement étant apparue dans certains cas comme un facteur influençant le niveau de résistance des plantes à certains stress ?

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal

I.I *Nicotiana sylvestris* WT et CMSII

Nicotiana sylvestris ($2n=24$) est l'ancêtre maternel diploïde du tabac cultivé *Nicotiana tabacum* ($2n=48$) ; le parent mâle étant *Nicotiana tomentosiformis*. Il s'agit d'une dicotylédone originaire d'Amérique du Sud appartenant à la famille des Solanacées. La lignée fertile sauvage (WT) provient de l'Institut du Tabac de Bergerac (SEITA/Altadis, France) et est maintenue au laboratoire par auto-fécondation.

Le mutant CMSII (*Cytoplasmic Male Sterile*) a été régénéré à partir de cals obtenus après deux cycles de cultures de protoplastes de la lignée sauvage *Nicotiana sylvestris* (Li et al., 1988) et est maintenu par rétrocroisement avec la lignée sauvage comme parent mâle. Cultivés dans les mêmes conditions que la lignée WT, les plants de CMSII montrent un retard de croissance et des dimensions adultes réduites (organes végétatifs et floraux). Une description détaillée de ce mutant ainsi que des études dont il a fait l'objet a été présentée dans le chapitre 'Introduction'.

I.II Conditions de culture

Nicotiana sylvestris est une plante de jours longs (16 h de photopériode) présentant un stade végétatif en rosette très prolongé (voir **figure 18**). Les plantes, de la germination à leur utilisation expérimentale, ont été cultivées en compartiments dans les serres associées au laboratoire 'Ecologie Systématique et Evolution'. Les conditions de croissance y sont contrôlées, avec une photopériode de 16 h, une température et une humidité relative jour/nuit respectivement de 23,5°C/17,5°C et 60%/50%. Les graines sont semées sur vermiculite, puis après trois semaines environ, les jeunes plantules sont repiquées en terrines une première fois comprenant 24 emplacements de 0,1 L environ chacun, puis une seconde fois dans en pots individuels d'un volume proche de 0,5 L.

Pour les différentes expériences réalisées, nous les choisissons à un même stade de développement: entre deux et quatre mois selon le génotype et les conditions de croissance, à un stade préfloraison à environ 8 feuilles (**figure 18**). Les expériences sont ensuite réalisées sur les premières feuilles matures.

II. Méthodes

II.I Indices stomatiques

Des empreintes stomatiques ont été effectuées à l'aide de vernis à ongles incolore sur les faces inférieures et supérieures des premières feuilles bien développées de plantes WT et CMSII cultivées sous 80 et 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Après solidification et séchage du vernis, la pellicule est décollée délicatement et mise sous lame et lamelle pour une observation sous microscope. Le nombre total de stomates (S) ainsi que le nombre de cellules épidermiques (E) dans le champ d'observation (objectif x20) sont alors comptés pour chaque face de trois à quatre feuilles par génotype et condition de croissance. L'indice stomatique, I, est alors déterminé selon l'équation: $I=S/(E+S)$.

II.II Absorbance, réflectance et transmittance

Les propriétés optiques des feuilles de plantes WT et CMSII cultivées sous 80 et 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ont été étudiées à l'aide d'un spectrophotomètre. Le principe repose sur l'utilisation d'une sphère intégratrice dont la surface interne est un miroir. La source de la lumière est placée à l'entrée de la sphère, et la lumière envoyée est réfléchiée dans toute la sphère ; la sphère est dite intégratrice car elle envoie de la lumière sur l'échantillon dans toutes les directions avec un flux constant. Cela permet d'éliminer toutes les irrégularités de mesure dues aux zones d'ombre et aux défauts de surface. Le spectromètre utilisé (Perkin Elmer Lambda 18 UV/VIS, Perkin-Elmer Corp., Norwalk, USA) est équipé d'une sphère intégratrice et les réflectance/absorbance/transmittance sont mesurées entre 400 et 700 nm par pas de 0,5 nm. Pour la mesure de la réflectance, un tube noir absorbant tout le rayonnement est disposé derrière la feuille.

II.III Echanges gazeux foliaires et fluorescence chlorophyllienne

II.III.1 Principes

Le principe des mesures des échanges gazeux foliaires décrit ci-dessous est identique pour les deux appareils utilisés au cours de cette étude (**figure 19**). Les échanges gazeux foliaires à la lumière correspondent à un flux sortant de vapeur d'eau (transpiration) et d'O₂ ainsi qu'à un

flux entrant de CO₂ (assimilation). Le principe de l'IRGA (Infra Red Gas Analysis) repose sur le fait que la vapeur d'eau et le CO₂ absorbent dans l'infrarouge mais pour des longueurs d'ondes différentes. Les mesures sont effectuées soit sur une feuille intacte non détachée de la plante (par exemple pour la réalisation des courbes d'assimilation en fonction de l'intensité lumineuse et des concentrations en CO₂ et O₂), soit sur une feuille coupée (par exemple pour une incubation dans une solution de MV à une concentration donnée). Cette feuille est placée dans une chambre d'assimilation balayée par un flux d'air dont les pressions partielles en CO₂ et en vapeur d'eau, les températures foliaires et de l'air ambiant sont suivies au cours du temps. Lorsque la chambre est éclairée, l'air passant autour de la feuille et quittant la chambre s'appauvrit en CO₂ et s'enrichit en vapeur d'eau. Ce sont les mesures des pressions partielles des gaz à l'entrée et à la sortie de la chambre qui permettent d'estimer les échanges gazeux foliaires. Les données de sortie (principalement l'assimilation nette de CO₂, la transpiration, et la conductance stomatique) sont calculées en utilisant le modèle de von Caemmerer et Farquhar (1981) en considérant la surface projetée de la feuille.

Le principe des mesures de la fluorescence chlorophyllienne est identique pour l'ensemble des appareils (Maxwell et Johnson, 2000, voir *figure 20*). Elles sont effectuées sur la face supérieure d'une feuille ou d'un disque foliaire et trois types de lumière sont utilisés:

- (1) une lumière analytique modulée, dont l'intensité est suffisamment faible pour ne pas modifier le rendement quantique de la photochimie (elle sert à analyser l'état d'extinction de la chlorophylle a du PS II);
- (2) une lumière actinique blanche d'intensité variable qui permet de moduler le rendement quantique de la photochimie;
- (3) un éclair actinique de lumière blanche de très forte intensité qui sature la photochimie (le rendement quantique de la photochimie tend alors vers zéro).

Plusieurs situations sont conventionnellement décrites pour caractériser les niveaux de fluorescence et permettre la détermination du rendement du PS II (Φ_{PSII}), de l'état de réduction des Q_A, ainsi que des quenchings (non) photochimiques qP (qN) (*figure 20*):

$F_0 \Rightarrow$ représente le rendement de la fluorescence émise quand tous les centres réactionnels sont ouverts, donc susceptibles de réaliser la stabilisation de charge (c'est à dire lorsque tous les accepteurs primaires des électrons émis par le PS II excité, que sont les Q_A, sont

oxydés). F_o est mesuré sur une feuille pré-adaptée à l'obscurité ou exposée à une lumière rouge sombre au moins 30 minutes, soumise uniquement à la lumière analytique modulée. Dans ces conditions, la photochimie représente la voie majeure d'utilisation de l'énergie du PS II (le rendement quantique de la photochimie tend vers sa valeur maximale);

$F_m \Rightarrow$ représente le rendement de la fluorescence émise lorsque tous les centres réactionnels sont fermés, donc incapables de réaliser la stabilisation de charge (c'est à dire lorsque tous les accepteurs primaires Q_A sont réduits). F_m est mesuré sur une feuille pré-adaptée à l'obscurité soumise à un éclair de lumière actinique saturante. Dans ces conditions, la probabilité pour que l'énergie d'un photon absorbée par l'antenne collectrice du PS II soit utilisée par la photochimie est nulle;

De façon symétrique, F'_o et F'_m correspondent aux quantités équivalentes mesurées sur des feuilles (pré)adaptées à la lumière;

$F_s \Rightarrow$ représente le rendement de la fluorescence émise quand la feuille préalablement adaptée à la lumière est soumise à un éclairage actinique d'intensité variable. Seule une partie des centres réactionnels est alors susceptible de réaliser la stabilisation de charge.

II.III.2 Courbes de réponses de l'assimilation nette de CO_2

L'assimilation carbonée ainsi que la fluorescence chlorophyllienne ont été mesurées sur des feuilles non détachées via, sauf mention, le Licor 6400-40 décrit ci-dessus dans différentes conditions d'apport en lumière, CO_2 et O_2 . Ces expériences sont réalisées à une température foliaire maintenue à 23°C.

II.III.2.a Réponse à l'intensité lumineuse incidente

La feuille placée sous la pince est acclimatée d'une part à l'obscurité pendant une heure environ afin de mesurer la respiration R_n ("night" respiration pour respiration à l'obscurité) puis d'autre part à la lumière (d'une intensité de 200 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ contenant 10% de lumière bleue) afin d'induire la photosynthèse et d'atteindre un état stationnaire. Cette deuxième étape nécessite 30 minutes à une heure environ selon les conditions de croissance des plantes mais également les génotypes, Dutilleul et al (2003a) ayant montré que l'induction de la photosynthèse dans ces conditions était plus lente chez les plantes CMSII comparativement aux plantes WT. Un programme est alors élaboré afin de faire varier

l'intensité lumineuse incidente, avec un pas de temps de 7 à 10 minutes, cinq facteurs (le flux d'air, les concentrations en H₂O et CO₂ entrant et sortant de la chambre) ayant été choisis pour définir la stabilité nécessaire au passage à l'étape suivante du programme. Les intensités lumineuses appliquées sont d'abord décroissantes puis augmentent jusqu'à 2000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour éviter une photoinhibition trop importante en cours d'expérience. La séquence est la suivante: 200, 125, 75, 25, 200, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Tout au long de l'expérience, les concentrations en CO₂ et O₂ de l'air arrivant dans la pince sont maintenues à des valeurs atmosphériques respectivement de 380 ppm et 210000 ppm. A chaque mesure, les paramètres de fluorescence chlorophyllienne F_o et F_m (pour les mesures à l'obscurité) et F'_o, F'_s et F'_m (mesures à la lumière) sont déterminés comme décrit dans les paragraphes suivants à l'aide de différents types de flashes lumineux.

Cette courbe a été répétée sous très faible concentration en O₂ selon le même schéma d'expérience avec toutefois une étape supplémentaire, à savoir l'acclimatation aux conditions de très faibles O₂ avant de lancer le programme.

II.III.2.b Réponse à la concentration en CO₂ de l'air environnant

Le principe est le même que celui décrit précédemment en faisant varier, pour une intensité lumineuse incidente constante, la concentration en CO₂ de l'air arrivant dans la pince (c_a). L'intensité lumineuse incidente a été définie comme saturante pour l'assimilation en CO₂ des plantes étudiées à l'aide des courbes précédentes : 800 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Les phases d'acclimatation (obscurité et induction de la photosynthèse sous faible éclaircissement puis sous l'éclaircissement saturant défini pour l'expérience) sont réalisées sous une concentration en CO₂ atmosphérique de 380 ppm. Une séquence de 10 concentrations en CO₂ est alors définie (380, 300, 200, 100, 60, 380, 600, 800, 1200, 2000 ppm) au sein d'un programme fonctionnant à l'image de celui décrit pour les variations d'apport lumineux. Tout au long de l'expérience, la concentration en O₂ de l'air arrivant dans la pince et l'intensité lumineuse incidente sont maintenues respectivement à 210000 ppm et 800 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Les paramètres de fluorescence chlorophyllienne F_o et F_m puis F'_o, F'_s et F'_m sont déterminés à chaque mesure.

Classiquement, les résultats sont représentés sous forme d'une courbe $A_n=f(c_i)$, c_i représentant la concentration en CO₂ dans les espaces intercellulaires, et non $A_n=f(c_a)$, afin de tenir compte des étapes de limitation à la diffusion du CO₂ dues à la cuticule et aux stomates. Cette courbe a de plus été réalisée sous très faible concentration en O₂ selon le même schéma avec une

étape supplémentaire d'acclimatation aux conditions de très faibles O₂ avant de lancer le programme.

II.III.2.c Calcul de la limitation stomatique

La limitation imposée par la résistance stomatique sur l'assimilation nette de CO₂ par les feuilles est calculée par une méthode dite d'élimination (Jones et al., 1985; Epron et al., 1995), pour laquelle:

$$L_s = 1 - (A_o / A_{max}) \quad (12)$$

où

A_o représente l'assimilation nette de CO₂ en conditions lumière-saturante sous CO₂ ambiant (ou sous lequel la plante a été cultivée si différent; ici $c_a=380$ ppm) et A_{max} , l'assimilation nette de CO₂ toujours en condition de lumière saturante mais pour laquelle la concentration en CO₂ dans les espaces intercellulaires (c_i) est égale à la concentration atmosphérique (c_a), c'est à dire à 380 ppm, éliminant ainsi la limitation due à la diffusion en phase gazeuse (passages de la couche limite et des stomates).

Ces données (A_{max} et A_o) sont obtenues à partir des courbes A_n/c_i décrites dans les paragraphes précédents. Un exemple de détermination de la limitation stomatique réalisée chez le tabac *Nicotiana sylvestris* est présenté dans la **figure 21** ci-contre.

II.III.2.d Réponses à la température externe

Deux séries d'expériences ont été menées: la réalisation de courbes de réponse de l'assimilation nette de CO₂ à la lumière à 4°C (à CO₂ et O₂ constants) et une courbe de réponse de l'assimilation nette de CO₂ à la température externe (à CO₂, O₂ et intensité lumineuse constants). Un dispositif de mesures des échanges gazeux foliaires basé sur le même principe que l'appareil 'LiCor' a été utilisé. Ce dispositif, ainsi que les chambres d'assimilation qui lui ont été associées sont décrits au niveau de la **figure 19B**. L'intérêt résulte dans (i) la présence d'une chambre d'assimilation parcourue par une circulation d'eau provenant d'un bain thermostaté afin d'obtenir des variations de températures rapides et des températures plus basses et plus hautes qu'avec le LiCor, et (ii) la possibilité de travailler sur de plus grandes surfaces foliaires.

II.III.2.e Réponses à un traitement associant une forte intensité lumineuse et un herbicide

Le dispositif LiCor est mis à profit ici afin d'étudier simultanément l'assimilation nette de CO₂ et le transport électronique d'une feuille coupée incubée dans une solution 1 mM de

méthylviologène (MV) soumise à un éclairage de 1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et des concentrations atmosphériques en CO_2 et O_2 (voir photos de la **figure 19A**).

Cette feuille est coupée puis immergée dans 40 mL d'eau dans un bécher. Elle y est recoupée afin d'éviter toute entrée d'air dans le flux transpiratoire. La feuille est alors insérée dans la pince du LiCor et est éclairée, en premier lieu à une intensité lumineuse modérée, puis à 1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Après stabilisation de l'assimilation nette de CO_2 et des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne, 10 mL d'une solution de MV 5 mM sont alors ajoutés aux 40 mL d'eau du bécher constituant une solution de 50 mL de MV 1 mM.

Le but est ici de calculer dans un premier temps la concentration en MV arrivant à l'intérieur des feuilles grâce au suivi de la transpiration foliaire (dont la mesure s'effectue simultanément et sur la même surface foliaire que pour l'assimilation et le transport électronique) afin dans un second temps de tracer une courbe représentant les cinétiques de diminution de l'assimilation nette de CO_2 et du transport électronique (en ordonnées) en fonction de la quantité de MV présente à l'intérieur des feuilles (en abscisse, remplaçant le paramètre temps). Sachant qu'une mesure est effectuée toutes les trois minutes, que la solution de MV dans laquelle la feuille est placée a un volume de 50 mL et une concentration de 1 mM, que la masse molaire de l'eau ($\text{MM}_{\text{H}_2\text{O}}$) est égale à 18 g mol^{-1} , et que la transpiration foliaire, notée t_r , nous est donnée en moles $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la quantité q de MV entrant à l'intérieur de la feuille en trois minutes (en $\mu\text{moles MV m}^{-2}$) est estimée selon la formule suivante:

$$q = \frac{t_r * 180}{1000} \cdot \text{MM}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \frac{1}{1000}$$

Cette valeur est rapportée à la surface foliaire impliquée pour les mesures des échanges gazeux et du transport électronique, à savoir 2 cm^2 . Le même calcul est effectué pour les trois minutes suivantes et la valeur obtenue est incrémentée à la précédente et ainsi de suite.

II.III.3 Electrode à oxygène

Cet appareil permet la mesure à tout moment de la concentration en dioxygène dans une chambre fermée. La méthode consiste à mesurer le courant électrique qui provient de la réaction d'oxydoréduction faisant intervenir l' O_2 dissous, l'électrode polarisée (ici la cathode de la platine) et la réaction d'oxydation d'une anode d'argent.

Il est composé d'une chambre contenant un ou plusieurs disques foliaires de surface donnée (dans notre cas, un disque de 3,5 cm de diamètre) et d'une chambre contenant les deux électrodes. Ces deux chambres sont séparées par une membrane de téflon semi-perméable, permettant la diffusion de l'O₂ dissous du milieu contenant le disque foliaire vers la chambre contenant les électrodes. Quand une différence de potentiel est appliquée entre les électrodes, l'électrode de platine se charge négativement (cathode : $2 \text{ Pt} + 4 \text{ e}^- \rightarrow 2 \text{ Pt}^{2-}$) tandis que l'électrode d'argent se charge positivement (anode: $4 \text{ Ag} \rightarrow 4 \text{ Ag}^+ + 4 \text{ e}^-$). Quand l'O₂ dissous diffuse à travers la membrane semi-perméable, il est réduit à la cathode de sorte qu'un courant se forme à travers le circuit (relié par une solution de KCl servant d'électrolytes) : l'argent est oxydé et du chlorure d'argent se dépose à l'anode. Le courant généré est proportionnel à la quantité d'O₂ dissous et les variations observées sont mesurées à l'aide d'un enregistreur.

Différentes manipulations sont nécessaires à l'obtention d'un enregistrement:

- un disque foliaire de 3,5 cm de diamètre est placé dans la chambre que l'on ferme hermétiquement. La distance entre le tracé d'une concentration d'O₂ à 0% (obtenu préalablement en appliquant une tension nulle ou en faisant passer de l'azote dans la chambre) et la concentration de 21% obtenue après stabilisation de l'électrode, nous permet de déterminer **A** (voir *figure 22*);
- une surpression est ensuite engendrée en injectant 1 mL d'air (21% O₂). L'électrode dévie proportionnellement au volume injecté et au volume de la chambre, déterminant **B** (voir *figure 22*);
- l'air est libéré. Afin d'éviter toute limitation en CO₂ dans la chambre, de l'air expiré est injecté (concentration > à 3%). Les mesures sont effectuées à environ 800 μmoles PAR m⁻² s⁻¹;
- les variations du stylet en fonction du temps reflètent une production d'oxygène à la lumière (ou à contrario sa consommation à l'obscurité). Lorsque la cinétique de la réaction est régulière, **la pente** de la courbe est mesurée et permet de déterminer la quantité d'O₂ dégagé par le disque foliaire.

Cette technique nous permet *in fine* de déterminer la capacité photosynthétique des différents plants étudiés (assimilation nette en conditions optimales de fort CO₂ et fort éclaircissement) en nous donnant l'O₂ consommé pour une surface foliaire et un temps donnés.

II.III.4 Fluorescence chlorophyllienne

II.III.4.a Pourquoi et comment la mesurer ?

En quelques mots, l'énergie d'une chlorophylle excitée a trois voies de dissipation possibles : la photochimie, le dégagement de chaleur ou la fluorescence (Butler et Kitajima, 1975 ; Kitajima et Butler, 1975). Ces trois phénomènes sont constamment en compétition. Ainsi, la mesure de changements de fluorescence chlorophyllienne nous renseignera quant à une différence de rendement de la photochimie ou de la dissipation thermique dans le même temps. Cette mesure associée aux échanges gazeux permet une étude plus complète de la photosynthèse foliaire et en particulier de ses réactions primaires associées au transport des électrons de la chaîne chloroplastique, en distinguant et quantifiant la part de l'énergie absorbée allouée (i) à la photochimie et (ii) au dégagement sous forme de chaleur. Cela permet de plus de mesurer le flux d'électrons passant par le PS II, une des premières cibles en cas de stress (Introduction).

II.III.4.b Paramètres de la fluorescence chlorophyllienne

Kautsky et al. (1931) ont observé une augmentation du rendement de la fluorescence après transfert de l'obscurité à la lumière, sur une période de 1 s (voir cinétique d'induction de la fluorescence chlorophyllienne, **figure 20**). Cette augmentation a ensuite été expliquée comme une conséquence de la réduction des accepteurs d'électrons, en aval du PS II, les plastoquinones, PQ, et en particulier, les Q_A (notion de centres ouverts/fermés). En effet, à un moment donné, la présence d'une certaine proportion de centres réactionnels fermés mène à une diminution globale du rendement de la photochimie, et donc à une augmentation du rendement de la fluorescence. A ce stade, deux paramètres peuvent être définis :

- le rendement quantique maximum des centres réactionnels des PS II, **ou** F_v/F_m , obtenu comme décrit précédemment en mesurant le signal fluorescence d'une feuille adaptée à l'obscurité, sous très faible lumière (quand virtuellement tous les centres PS II sont ouverts: F_o); et pendant un pulse de lumière supersaturant (quand virtuellement tous les centres PS II sont fermés: F_m) :

$$F_v / F_m = (F_m - F_o) / F_m \quad (13)$$

- le rendement quantique dit opérationnel des centres réactionnels des PS II, **ou** F'_v/F'_m , obtenu comme le rapport F_v/F_m mais pour une feuille adaptée à la lumière:

$$F'_v / F'_m = (F'_m - F'_o) / F'_m \quad (14)$$

Sur une échelle de temps de quelques minutes, le rendement de la fluorescence chlorophyllienne commence à chuter : une chute du rendement de fluorescence suit le pic F_m d'émission, jusqu'à atteindre un état stationnaire de fluorescence: F_s (**figure 20**). De ce paramètre F_s , nous pouvons déduire en relation avec les mesures précédentes, la proportion de lumière absorbée par chlorophylle associée au PS II, qui est utilisée pour la photochimie, autrement dit le rendement quantique de la photochimie au niveau des PS II, Φ_{PSII} (pour une feuille adaptée à la lumière):

$$\phi_{PSII} = (F'_m - F'_s) / F'_m \quad (15)$$

A partir des mesures d'échanges gazeux foliaires, le rendement quantique de l'assimilation du CO_2 , Φ_{CO_2} , peut être défini :

$$\phi_{CO_2} = (A_n - R_d) / (I \cdot \alpha) \quad (16)$$

où

I désigne la répartition de l'énergie incidente entre les PS I et PS II (classiquement égal à 0,5 chez les plantes C3) et α le coefficient d'absorption des feuilles (environ 0,85 mais qui sera recalculé au cours de ce travail pour les plantes étudiées).

La chute de la fluorescence chlorophyllienne décrite au dessus peut s'expliquer de 2 façons (voir légende de la **figure 20**) : (1) une augmentation de la vitesse avec laquelle les électrons sont transportés hors du PS II (**qP**), via la lumière par ouverture des stomates et activation d'enzymes impliquées dans le métabolisme carboné, et (2) une augmentation du rendement avec lequel l'énergie est convertie en chaleur (**qN** et **NPQ**). Le rendement de la fluorescence est diminué à cause d'une compétition entre les réactions photochimiques et les autres voies de dé-excitation de la chlorophylle. On définira dès lors comme **quenching**, tout processus diminuant le rendement de la fluorescence chlorophyllienne sous son maximum. Deux types de quenching sont définis, le quenching photochimique (qP) incluant la photosynthèse et la photorespiration et le quenching non photochimique (qN ou NPQ) reflétant les mécanismes de dissipation de l'énergie d'excitation sous forme de chaleur:

$$qP = (F'_m - F'_s) / (F'_m - F'_o) \quad (17)$$

$$qN = (F_m - F'_m) / (F_m - F'_o) \quad (18)$$

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m \quad (19)$$

Les mesures de fluorescence chlorophyllienne permettent également d'estimer le flux linéaire d'électrons au niveau des PS II, ETR (Electron Transport Rate):

$$ETR = \phi_{PSII} \cdot PFD \cdot (I \cdot \alpha) \quad (20)$$

où

PFD désigne l'intensité lumineuse incidente (en $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$);

I et α ont été définis précédemment respectivement comme la répartition de l'énergie incidente entre les PS I et PS II (0,5) et le coefficient d'absorption des feuilles.

II.III.4.c Mesures du flux cyclique d'électrons autour du PS I

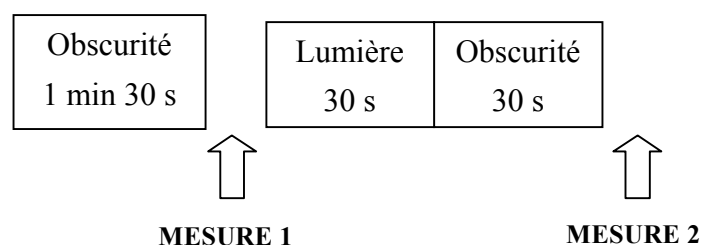
Les mesures du flux d'électrons circulant autour du PS I sont effectuées à l'aide d'un fluoromètre modulé PAM-100 (Walz-Effeltrich) relié à un ordinateur pour l'acquisition des données. Il permet de réaliser différentes cinétiques de l'induction de la fluorescence chlorophyllienne et de la réduction du PS I. Il est composé d'un boîtier comprenant le fluoromètre et le contrôle de la lumière blanche (son intensité et sa durée peuvent être modulées). Trois connexions partent de ce boîtier pour se rejoindre (« guide light ») et diffuser la lumière jusqu'à la feuille (Ducruet et al., 2005) : un fil transmet la lumière blanche (ou actinique), un second la lumière rouge sombre (700 nm) et le dernier relié au PAM permet la mesure de l'oxydoréduction du PSI (800 nm). Le « guide light » est fixé sur une pince dans laquelle circule de l'eau. Sa température est régulée par un bain thermostaté et un thermomètre à contact. Un thermocouple relié à la pince nous permet de connaître la température au niveau de la feuille.

II.III.4.c1 Mesure du niveau de saturation de PS I

L'amplitude des cinétiques varie selon l'intensité de la lumière blanche appliquée sur la feuille. Le niveau de saturation du PS I, c'est-à-dire l'oxydation maximale observable (amplitude maximale des cinétiques) est mesurée.

II.III.4.c2 Mesure du flux cyclique des électrons autour de PS I

Cette mesure est effectuée pour chaque plante, préalablement placée 24 h à l'obscurité à 25°C selon le protocole suivant :



Une mesure correspond à une cinétique, c'est-à-dire qu'un flash de lumière rouge sombre de 20 secondes est envoyé sur la feuille permettant d'observer l'oxydation puis la réduction du PS I. Différentes intensités de lumière rouge sombre ont été testées afin de s'assurer de la saturation du PS I dans nos conditions expérimentales.

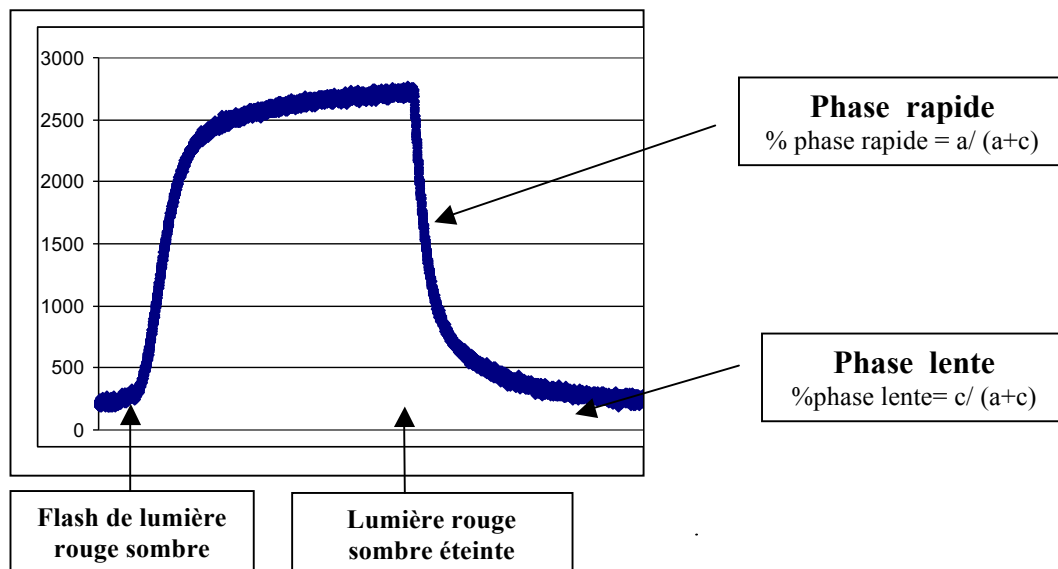
II.III.4.c4 Analyse des cinétiques

Pour chaque cinétique, l'amplitude de la courbe exponentielle (valeur maximale – valeur minimale) est déterminée, chaque courbe exponentielle étant analysée à l'aide du logiciel Sigma Plot 6.00. Différents paramètres sont calculés à partir de l'équation de la courbe :

$$y=y_0+a e^{-bx}+c e^{-dx}$$

avec **a** représente l'amplitude de la phase rapide et **c** celle de la phase lente

b représente la constante de la phase rapide et **d** celle de la phase lente



Les constantes de temps $T_{0b}=(0.01*0.68)/b$ et $T_{0d}=(0.01*0.68)/d$ de la réduction du PS I durant les phases rapide et lente sont exprimées en secondes. Elles représentent la quantité de flux d'électrons autour du cytochrome b_6/f au moment où la feuille se trouve à l'obscurité.

II.IV Détermination de g_m par analyse des isotopes stables du carbone

II.IV.1 Prérequis théoriques

L'outil des isotopes stables a été mis à profit dans cette étude en vue de la détermination *in vivo* de la conductance interne à la diffusion du CO_2 , g_m .

La discrimination isotopique liée à l'assimilation photosynthétique de CO₂ est due à deux étapes discriminantes principales responsables: (i) la diffusion du CO₂ de l'air de l'atmosphère jusqu'à l'intérieur de la feuille (a : 4,4‰; Craig, 1954) et (ii) la carboxylation dans les chloroplastes du ribulose-1,5-bisphosphate par la Rubisco (b : 29‰; Roeske et O'Leary, 1984; Guy et al., 1993). D'autres facteurs physiologiques (dont la concentration externe et intercellulaire en CO₂, respectivement c_a et c_i) sont également compris dans l'expression de la discrimination du carbone (Δ) donnée par Farquhar et al. (1982):

$$\Delta_{(i)} = a + (b - a) \cdot c_i / c_a \quad (11)$$

Farquhar et al. (1982) ont également intégré d'autres composantes à la discrimination, avec les étapes de dissolution puis de diffusion du CO₂ en phase aqueuse à l'intérieur de la feuille, et en prenant en compte également la photorespiration et la respiration à la lumière. La discrimination diffusionnelle, pourra donc être subdivisée en trois composantes, liées aux passages de la couche limite (a_b), des stomates (a) et à la dissolution et la diffusion du CO₂ en phase liquide (a_i). Ainsi, la discrimination globale observée durant la photosynthèse est :

$$\Delta_{obs} = a_b \cdot (c_a - c_s) / c_a + a \cdot (c_s - c_i) / c_a + a_i \cdot (c_i - c_c) / c_a + b \cdot c_c / c_a - d \quad (21)$$

où

c_s et c_c représentent respectivement les pressions partielles de CO₂ au niveau de la couche limite et des sites de carboxylation et d correspond à la (photo)respiration.

Nous supposons ensuite un état stationnaire, c'est-à-dire que tout ce qui rentre via c_a est égal à ce qui entre dans les cellules. Dès lors, en négligeant l'effet de la couche limite ($c_s = c_a$), nous pouvons écrire :

$$-\Delta_{obs} + \Delta_i = a_i \cdot (-c_i + c_c) / c_a + b \cdot (-c_c + c_i) / c_a - d \quad (22)$$

Sachant ensuite que $A_n = g_s (c_a - c_i) = g_m (c_i - c_c)$, l'équation devient :

$$\Delta_i - \Delta_{obs} = (b - a_i) / g_m \cdot A_n / c_a + d \quad (23)$$

où

a_i et b sont respectivement égaux à 1,8‰ et 29‰ ; A_n représente l'assimilation nette de CO₂ ($\mu\text{moles CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) et g_m représente la conductance interne à la diffusion du CO₂ ($\text{moles CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

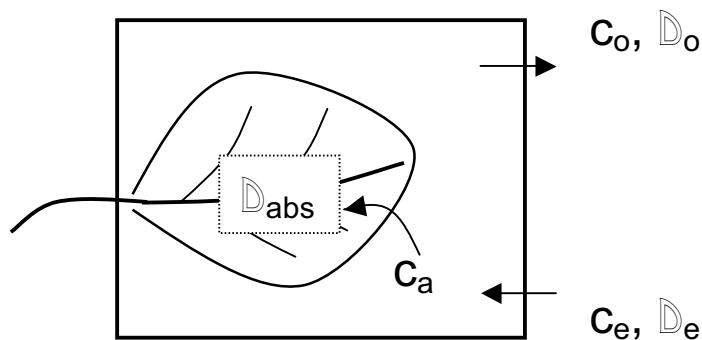
Ainsi, en traçant la relation $\Delta_i - \Delta_{obs} = f(A_n/c_a)$ pour au moins trois intensités lumineuses incidentes, la pente de la droite obtenue nous donne une valeur numérique de g_m . L'objectif va dès lors consister en l'obtention de mesures expérimentales de Δ_{obs} .

II.IV.2 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est décrit au niveau de la **figure 23** ci-contre.

Le principe est d'associer un système ouvert de mesure des échanges gazeux à un spectromètre de masse isotopique (S.M.I.). La comparaison de la composition de l'air avant et après le passage dans la chambre d'assimilation permet d'obtenir la quantité de CO₂ échangée par unité de surface et de temps (LiCor 6400) ainsi que sa signature isotopique, le système étant couplé ici à un S.M.I. (Optima, Micromas, Villeurbanne, France) en flux continu.

Ce système peut-être simplifié de la manière suivante:



Comme l'assimilation nette de CO₂, déterminée par le Licor 6400, la discrimination isotopique photosynthétique est mesurée par comparaison de la composition de l'air entrant (obtenue avec la chambre vide) avec celle de l'air sortant de la chambre d'assimilation, prenant ainsi en compte ce que la feuille a assimilé. Dès lors,

$$C_e \cdot \delta_e = C_o \cdot \delta_o + (C_e - C_o) \cdot \delta_{abs} \quad (24)$$

Par définition, nous écrivons une discrimination comme suit :

$$\Delta_{obs} = (\delta_{source} - \delta_{produit}) / (\delta_{produit} + 1)$$

$$\text{soit dans notre cas, } \Delta_{obs} = (\delta_o - \delta_{abs}) / (\delta_{abs} + 1) \quad (25)$$

En remplaçant Δ_{obs} dans l'équation (25), nous obtenons la relation (Evans et al., 1986) :

$$\Delta_{obs} = \xi(\delta_o - \delta_e) / (1 + \delta_o - \xi(\delta_o - \delta_e)) \quad (26)$$

où $\xi = C_e / (C_e - C_o)$.

Nous utilisons un gaz de référence, dont δ_e est connu et mesuré périodiquement avec la chambre vide (dans notre cas, $\delta_e \simeq -51\text{‰}$). δ_o est mesuré au niveau de l'air sortant, soit directement lorsque l'expérience se fait « ON LINE » au niveau du spectromètre de masse isotopique, soit lors d'expériences « OFF LINE » après stockage des gaz sortants dans des ballons hermétiques. Une comparaison entre $(\Delta_i - \Delta_{obs})$ et A_n/c_a est obtenue pour chaque intensité lumineuse incidente. C'est pourquoi, au moins trois seront nécessaires afin de tracer une droite $(\Delta_i - \Delta_{obs}) = f(A_n/c_a)$. La détermination de la pente de cette droite nous donnera g_m selon l'équation (23) en utilisant des valeurs pour b et a_i respectivement de 1,8‰ et 29‰.

II.V Calculs basés sur les mesures conjuguées des échanges gazeux foliaires et de la fluorescence chlorophyllienne

II.V.1 Respiration à la lumière

Comme décrit dans le chapitre Introduction (pages 37 à 39 et **figure 12**), la respiration mitochondriale persistant à la lumière (R_d) a été estimée selon la méthode proposée par Laisk (1977) en réalisant des courbes A_n/c_i pour de faibles c_i (120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50 ppm) et sous trois intensités lumineuses incidentes: 800, 500 et 100 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Le point d'intersection obtenu entre ces trois courbes nous donne la concentration intercellulaire en CO_2 , c^* (en abscisse) pour laquelle l'assimilation nette est égale à R_d (en ordonnée). Toutefois, cette valeur de c^* , basée indirectement sur les concentrations en CO_2 intercellulaires (c_i) et non chloroplastiques (c_c), pourrait sous-estimer la valeur réelle de Γ^* , concentration intrachloroplastique en CO_2 en l'absence de respiration mitochondriale (von Caemmerer et al., 1994) en ne tenant pas compte de la résistance due à la diffusion du CO_2 des espaces intercellulaires vers les chloroplastes. Une correction peut être apportée à c^* à partir des valeurs de R_d et de conductance interne g_m selon (von Caemmerer, 2000):

$$\Gamma^* = c^* + R_d/g_m \quad (27)$$

Dans notre étude, g_m est déterminée expérimentalement par spectrométrie de masse isotopique pour une concentration en CO_2 de l'air ambiant de 400 ppm. L'utilisation de cette formule pour la détermination de Γ^* est donc soumise à l'hypothèse d'un g_m constant quelques soient les concentrations en CO_2 de l'air environnant.

II.V.2 Facteur de spécificité apparent de la Rubisco

Le facteur de spécificité apparent S_{app} de la Rubisco est calculé à partir des valeurs de c^* ou de Γ^* définies précédemment, qui donneront respectivement les valeurs $S_{app\ c_i}$ et $S_{app\ c_c}$ selon Laing et al (1974) et von Caemmerer (2000) via l'équation (7) déjà proposée en Introduction. Nous pouvons toutefois la reformuler ainsi:

$$S_{app\ c_c} = O/2\Gamma^* \quad (28)$$

où

O représente la concentration chloroplastiques en O_2

on peut remplacer Γ^* par c^* pour obtenir la valeur de $S_{app\ c_i}$

II.V.3 Réactions de carboxylation et d'oxygénation de la Rubisco (vitesses et flux d'électrons)

Les vitesses de carboxylation (V_c) et d'oxygénation (V_o) sont calculées comme décrit par l'équation (4) à partir du facteur de spécificité de la Rubisco (dans notre cas facteur de spécificité apparent) et du rapport des concentrations chloroplastiques en CO_2 et O_2 .

$$V_c / V_o = S_{app\ c_c} \cdot c_c / O \quad (29)$$

Les vitesses maximales de carboxylation de la Rubisco ($V_{c\ max}$) ainsi que le flux total des électrons (J_t) ont été estimés en réalisant une régression optimale en dessous et au dessus l'inflexion de la courbe de réponse de l'assimilation nette de CO_2 à la pression partielle de CO_2 intercellulaire, en utilisant la méthode de McMurtrie et Wang (1993).

Une autre méthode a été utilisée pour déterminer $V_{c\ max}$ en retraçant les courbes A_n/c_i pour des c_i limitants sous la forme de relations de type Lineweaver-Burke $1/A_n = f(1/c_i - \Gamma)$. $V_{c\ max}$ est alors déterminée comme l'inverse du point d'intersection de la courbe obtenue avec l'axe des ordonnées.

Le flux total d'électrons de la chaîne photosynthétique chloroplastique (J_t) peut être subdivisé en deux composantes associées aux réactions de carboxylation (J_c) et d'oxygénation (J_o) de la Rubisco. En supposant la photorespiration et l'assimilation de CO_2 comme les deux seules réactions en compétition pour ces électrons (Genty et al., 1989), nous pouvons écrire:

$$J_t = [J_c + J_o] \quad (30)$$

Comme quatre électrons sont nécessaires à la réalisation d'un cycle de carboxylation et d'oxygénation, et qu'une molécule de CO_2 est dégagée tous les deux cycles d'oxygénation par la décarboxylation de deux molécules de glycine au cours de la photorespiration (Laing et al., 1974), le flux d'électrons dirigé vers les réactions de carboxylation de la Rubisco peut s'exprimer sous la forme:

$$J_c = [4A_n + 0,5J_o + 4R_d] \quad (31)$$

En combinant les équations (30) et (31), les flux d'électrons dirigés vers l'une ou l'autre des réactions de la Rubisco sont calculés à partir du flux total d'électrons (J_t), de l'assimilation nette de CO_2 et de la respiration à la lumière R_d :

$$J_c = \frac{1}{3} [J_t + 8(A_n + R_d)] \quad (32)$$

$$J_o = \frac{2}{3} [J_t - 4(A_n + R_d)] \quad (33)$$

II.VI Dosage des protéines solubles totales et des pigments

II.VI.1 Protéines solubles totales

II.VI.1.a Extraction

En vue des mesures d'activités enzymatiques et de quantité de pigments (chlorophylles et caroténoïdes), différents protocoles d'extraction des protéines solubles totales foliaires ont été entrepris. Ils font intervenir trois types de tampon, un tampon potassium-phosphate (chlorophylles, caroténoïdes, Catalase, Glycolate Oxydase), un tampon Tris-HCl (Ascorbate peroxydase) et un tampon Hépès-KOH (Rubisco, Saccharose-phosphate-synthase, NADP-Malate Déshydrogénase). Ces protocoles seront exposés au fur et à mesure dans ce chapitre.

II.VI.1.b Dosage

Environ 100 mg de matériel foliaire sont broyés dans l'azote liquide et les protéines totales sont extraites dans 300 µL d'un tampon d'extraction 0,1 M Tris-HCl pH 8,1 contenant 10% de saccharose (m/v) et 0,05% de β-mercaptoéthanol (v/v: protège la structure des protéines et leur activité). L'extrait est centrifugé 5 min à 15000 g à 4°C afin de sédimenter le matériel non soluble. La quantité de protéines présentes dans le surnageant est dosée à 595 nm, suivant la méthode de Bradford, avec une gamme de Sérum Albumine Bovine, SAB (Bradford, 1976).

Les mesures des pigments et des différentes activités enzymatiques ont été réalisées sur des échantillons protéiques frais (n'ayant pas subi de cycles congélation/décongélation après extraction).

II.VI.2 Chlorophylles et caroténoïdes

Les disques, auparavant plongés dans l'azote liquide, sont broyés sur la glace dans 5 mL de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7,5.

Dans un tube en verre à centrifuger et sous la hotte, 4 mL d'acétone sont ajoutés à 1 mL du broyat obtenu (le reste de broyat est utilisé pour les mesures des activités Catalase et/ou Glycolate oxydase). Le tout est agité au vortex et placé à l'obscurité pendant minimum 30 min. Il est ensuite centrifugé 10 min à 3000 g. Le surnageant est prélevé, et mesuré au spectrophotomètre. La mesure est réalisée contre une solution (blanc) de 80% d'acétone. Les résultats sont exprimés en concentration de chlorophylle : en mg/unité de surface (m^2) ou en mmoles/moles chlorophylles pour les caroténoïdes et ont été obtenus à partir des formules suivantes (Porra et al., 1989):

$$\text{Chlorophylle a (mg/L)} = 11.78 * (A_{663.6} - A_{750}) - 2.29 * (A_{646} - A_{750})$$

$$\text{Chlorophylle b (mg/L)} = 20.05 * (A_{646} - A_{750}) - 4.77 * (A_{663.6} - A_{750})$$

$$\text{Chlorophylles totales (mg/L)} = \text{Chlorophylle a} + \text{Chlorophylle b}$$

$$\text{Caroténoïdes (mg/mL)} = 0.0005 * (A_{480} + 0.114 * A_{663.6} - 0.638 * A_{646})$$

Les valeurs des longueurs d'ondes auxquelles se font les mesures sont déterminées en fonction des spectres d'absorption respectifs de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et des caroténoïdes. Les facteurs qui y sont associés dépendent quant à eux des propriétés du spectrophotomètre.

II.VII Activités enzymatiques

II.VII.1 Catalase (CAT: EC 1.11.1.6)

4 mL du broyat obtenu comme décrit précédemment après extraction de matériel foliaire dans 5 mL de tampon phosphate 50 mM (pH 7,5) sont centrifugés 10 min à 10000 g et à 4°C. Le surnageant est prélevé, et permettra de mesurer l'activité enzymatique.

La décomposition du peroxyde d'hydrogène par la catalase est suivie pendant 1 min au spectrophotomètre (logiciel WINLAB) sous UV à 240 nm. Une cuve en quartz renferme le milieu réactionnel (3 mL) qui est constitué de 20 µL du surnageant, et 2,98 mL de tampon H (correspondant à 50 mL de tampon KH₂PO₄/K₂HPO₄ à 100 mM, pH 7 complété par 80 µL d'une solution de H₂O₂ à 30% initiant la réaction). Un témoin (blanc) est réalisé en remplaçant l'extrait par un même volume de tampon phosphate. L'activité mesurée correspond à l'activité totale de l'enzyme et est exprimée en µmoles de H₂O₂ dégradées min⁻¹ cm⁻² d'après la formule suivante:

$$\left[\frac{[\delta\text{DO} (\text{/min}) * \text{volume de la cuve (mL)} * \text{volume total du broyat (mL)}]}{[\varepsilon (\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) * \text{volume de l'échantillon (mL)} * \text{trajet optique (cm)}] * [(\text{surface foliaire broyée (cm}^2\text{)}]} \right] * 1000$$

II.VII.2 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco: EC 4.1.1.39)

Il s'agit de mesurer *in vitro* l'activité carboxylase de l'enzyme (i) telle qu'elle existe dans l'échantillon (Activité initiale: Act_i) et (ii) en conditions optimales (Activité totale: Act_t) après pré-traitement de l'échantillon permettant la carbamylation (donc l'activation) des sites libres mais initialement non actifs. Le protocole a été modifié de Dizengremel et al. (1994).

II.VII.2.a Extraction et dessalage des protéines solubles totales

Environ 100 mg de matériel frais (sous la forme de deux disques foliaires) sont broyés dans l'azote liquide et extraits dans 5 mL de tampon d'extraction contenant 100 mM Hépès-KOH (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 6% (m/m) polyvinylpyrrolidone-25, 7% (m/m) polyéthylène glycol 20000, 2mM dithiothréitol, 10% (v/v) glycérol, 20 µM 4-amidinophénylméthanesulfonylfluoride, 1 µM pepstatine and 1 µM leupeptine. 50% (m/m) de polyvinylpolypyrrolidone sont ajoutés pendant le broyage. Le broyat obtenu est

centrifugé 30 min à 4°C et 15000 rpm. Le surnageant est alors récupéré et constituera l'extrait brut.

Un volume de 2,5 mL de cet extrait brut est passé sur colonne de dessalage Sephadex G25M (préalablement saturées en tampon d'élution par 3 passages successifs; Amersham, Suède) afin d'éliminer les composés de faible masse moléculaire (< 50 kDa) tels que les sels, les composés phénoliques ou les cofacteurs pouvant interférer avec l'activité enzymatique. L'extrait est ensuite élué par passage de 3,5 mL de tampon d'élution sur ces mêmes colonnes, l'éluat constituant l'extrait purifié. Le tampon d'élution comprend 100 mM d'Hépès-KOH (pH 7,5), 5 mM de MgCl₂, 2 mM de dithiothréitol et 10% (v/v) de glycérol (Fontaine, 1999).

II.VII.2.b Dosage des activités initiales et totales

Les activités initiales et totales ont été mesurées dans 800 µL de milieu réactionnel contenant 100 mM de Bicine-KOH (pH 8), 25 mM de NaHCO₃, 20 mM de MgCl₂, 5 mM de créatine phosphate, 0,25 mM de NADH, 3,5 mM d'ATP, 5 U/mL de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, 5 U/mL de phosphoglycérokinase et 5 U/mL de créatine phosphokinase. La réaction est initiée par l'ajout de 0,5 mM de RubP. Pour l'activité totale, l'extrait purifié est préincubé avant le passage au spectrophotomètre 12 min à 25°C dans le milieu réactionnel. Les activités sont déterminées par suivi de l'oxydation du NADH en NAD⁺ à 340 nm.

Les résultats bruts obtenus sont exprimés à partir de la loi de Beer-Lambert et en tenant compte des facteurs de dilution, en nkatal, c'est à dire en nmoles de NADH oxydées par seconde puis rapportés à la surface foliaire. Afin de mettre en relation ces résultats avec les assimilations de CO₂ obtenues par ailleurs, ces résultats bruts sont transformés et les valeurs numériques divisées par deux (la chaîne de réaction impliquée ici mettant en jeu deux molécules de NADH pour une molécule de CO₂) afin d'exprimer les activités initiales et totales de la rubisco en µmoles de CO₂ par m² et par seconde.

II.VII.3 Saccharose Phosphate Synthase (SPS: EC 2.4.1.14)

La composition des tampons utilisés pour ce dosage est décrite sur la **figure 24** ci-contre.

L'extraction se fait sur 70 à 80 mg de matériel frais, broyés dans l'azote liquide, 100 mg de sable de Fontainebleau et 960 µL de tampon E. Après décongélation partielle des broyats, ceux-ci sont transférés dans des tubes ependorff et centrifugés 10 min à 4°C et 13000 g. Le

surnageant est récupéré puis 500 µL sont passés sur une colonne de dessalage préalablement équilibrée avec du tampon R. L'éluat constitue notre extrait. Trois tubes nécessaires à la mesure des activités SPS_{lim} et SPS_{max}: un témoin "0" (sans saccharose), un témoin "Std" (avec une quantité connue de saccharose, 10 µg) et un tube "Mesure" (avec l'extrait foliaire, et sans saccharose). 50 µL de l'éluat sont ajoutés à chaque tube. La séquence de réactions intervenant jusqu'au dosage spectrophotométrique des échantillons est décrite au niveau de la **figure 24**.

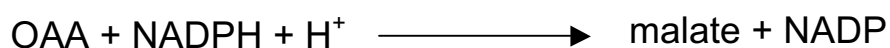
Les activités, exprimées en µmoles saccharose m⁻² s⁻¹, sont obtenues avec la relation:

$$\text{Act} = \frac{10 \cdot 10^{-6}}{\epsilon_{\text{sach}}} \cdot \text{Dilution} \cdot \frac{960}{50} \cdot \frac{(\text{DO}_{\text{« Mesure »}} - \text{DO}_{\text{« 0 »}})}{(\text{DO}_{\text{« Std »}} - \text{DO}_{\text{« 0 »}})} \cdot \frac{1}{\text{Temps (s)}} \cdot \frac{1}{\text{Surface (m}^2\text{)}}$$

II.VII.4 NADP malate déshydrogénase (NADP-MDH: EC 1.1.1.82)

Le protocole utilisé a été mis au point à partir de celui rédigé par Trévanion et al (1997) à la différence que nous utilisons de la thiorédoxine dans le milieu d'incubation pour la détermination de l'activité maximale de l'enzyme.

Environ 100 mg d'échantillon sont broyés dans de l'azote liquide puis dans 1 mL de tampon d'extraction contenant 25 mM d'Hépès-KOH (pH 7,5), 10 mM de MgSO₄, 1 mM de Na₂EDTA, 5 mM de DTT, 1 mM de PMSF (cocktail d'antiprotéases), 5% de PVP insoluble (m/v), 0,05% de Triton X-100 (v/v). Après homogénéisation au vortex, le broyat est centrifugé 5 min à 15000 rpm et 4°C. L'activité initiale de l'enzyme est mesurée directement sur le surnageant, alors qu'une partie de ce surnageant est incubée 30 min à 25°C dans un milieu contenant 40 mM de Tricine-KOH (pH 9), 0,4 mM de Na₂EDTA, 120 mM de HCl, 100 mM de DTT, 20 µm de thiorédoxine et 0,0025% de Triton X-100 (v/v), afin d'estimer l'activité maximale. Le principe de la mesure est de suivre la réaction :



Ainsi, le milieu réactionnel (1 mL au final) est composé de 25 mM Tricine-KOH (pH 8,3), 150 mM de KCl, 1 mM d'EDTA, 5 mM de DTT, 0,2 mM de NADPH, 2 mM d'OAA et 20 µL d'échantillon. L'OAA est ajouté à la fin pour initier la réaction dans la cuvette de mesure uniquement, un volume équivalent d'eau est ajouté dans la cuvette de référence. La cinétique de disparition du NADPH ($\epsilon_{\text{NADPH}}=6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) est suivie pendant 5 min, et la moyenne

de diminution de l'absorbance à 340 nm est calculée. Le calcul de l'activité enzymatique utilise la loi de Beer-Lambert en tenant compte des facteurs de dilution. Les résultats seront exprimés en $\mu\text{moles NADPH m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

II.VII.5 Glycolate oxydase (G.O.: EC 1.1.3.1)

Environ 0,3 g de matériel végétal foliaire sont broyés dans un mortier dans de la glace et extraits dans 5 mL de tampon phosphate ($\text{KH}_2/\text{K}_2\text{H PO}_4$, 50 mM et pH 7,5). Le broyat obtenu est centrifugé 10 min à 4°C et 8000 g. Le surnageant est prélevé et constitue l'extrait. Le milieu réactionnel comprend 0,5 mL d'eau distillée, 2,2 mL de tampon Triéthanolamine 0,05 M (pH 7,8), 0,05 mL Triton 0,5% (v/v), 0,05 mL de FMN 12 mM, 0,1 mL de Phénylhydrazinehydrochloride 0,1 M (pH 6,8) et 0,05 mL d'extrait. La réaction est initiée par ajout de 0,05 mL de glycolate 0,3 M (pH 7,0). Le mélange est alors incubé 4 min à 25°C avant de suivre la réaction à 324 nm sur trois minutes au spectrophotomètre. En effet, le glyoxylate a la propriété de se combiner avec la phénylhydrazine pour donner un composé coloré, le glyoxylate-phénylhydrazone, qui présente une absorption à 324 nm. Deux contrôles sont réalisés en remplaçant le glycolate ou l'extrait par un même volume d'eau distillée. Le calcul de l'activité enzymatique utilise la loi de Beer-Lambert, le coefficient d'extinction moléculaire de la phénylhydrazone à 324 nm étant de $\epsilon = 1,7 \cdot 10^7 \text{ moles}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$. Les résultats seront exprimés en $\mu\text{kat m}^{-2}$.

II.VII.6 Activité SOD sur gel (SOD: EC 1.15.1.1)

II.VII.6.a Extraction des Protéines et électrophorèse PAGE

150 μL de tampon sont utilisés par cm^2 de matériel foliaire. Le broyage est effectué dans l'azote liquide dans un tampon d'extraction contenant 0,1 M de Tris-HCl (pH 8), 10% (m/v) de saccharose, 0,5 mM de Pefablock (cocktail d'inhibiteurs de protéases) et 0,2% (v/v) de β -mercaptoéthanol. L'échantillon est vortexé (au moins 10-15 secondes) puis centrifugé 5 min à 20000 g. Le surnageant est récupéré et centrifugé 30 min à 65000 rpm sur ultracentrifugeuse TL100 (rotor Beckman TL100.A2) afin d'éliminer les débris membranaires. Le surnageant récupéré et 3 μL sont utilisés pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976). L'équivalent de 75 μg de protéines sont mélangés v/v avec un tampon de solubilisation Laemmli 2X non dénaturant, réducteur (voir **figure 28**, avec 0,2% (v/v) de β -mercaptoéthanol) puis sont chargés sur un gel NATIVE-PAGE gradient d'acrylamide 7,5%.

La migration se fait sur environ 5 h à 170 V à 4°C, avec un tampon d'électrophorèse Tris-Glycine froid (Tris 25 mM et Glycine 192 mM).

II.VII.6.b Révélation des activités SOD (d'après Beauchamp et Fridovitch, 1971)

Le tampon de révélation est préparé 30 min avant la fin de la migration. Pour un grand gel (13 cm sur 13), il contient 100 mL de Tris-HCl (pH 8,0; 50 mM), 4 mg de Riboflavine, 2 mg d'EDTA₄, et 20 mg de Nitro Blue Tétrazolium, NBT ajouté au dernier moment.

Après migration, le gel est incubé 30 min à l'obscurité, sous agitation. La révélation se fait en plaçant le gel sur une source lumineuse (de 10 à 30 min voire plus). Le principe est de se servir de l'énergie lumineuse pour générer de l'O₂⁻ et d'utiliser le NBT pour détecter ce radical. L'activité superoxyde dismutase inhibe la formation de Bleu Formazan et peut être quantifiée selon ce principe : l'activité SOD se manifeste par des zones achromatiques sur le gel uniformément bleu. Les isoformes SOD ont été identifiées avec des inhibiteurs: 5mM H₂O₂ inhibant Cu/Zn SOD et Fe SOD tandis que 3mM KCN inhibe Cu/Zn SOD (voir *annexe 2*). Les bandes ont été quantifiées en utilisant le logiciel 'ScionImage' (intégrant la surface et l'intensité du signal).

II.VIII. Analyse des acides ribonucléiques totaux foliaires

II.VIII.1 Extraction des ARNs totaux

L'extraction des ARNs totaux se fait d'après la méthode TRIzol (TRIzol Reagent, GIBCO BRL). Les échantillons foliaires sont prélevés avec un emporte-pièce et plongés immédiatement dans l'azote liquide. Après broyage à froid avec un appareil 'MM 300' (Retsch®), les extraits sont homogénéisés dans 1 ml de TRIzol (dissociation des complexes nucléoprotéiques) puis 300 µL de chloroforme sont ajoutés. Après centrifugation 15 min à 12 000 g et 4°C, les ARNs se trouvent exclusivement dans la phase aqueuse supérieure, qui est prélevée. Les ARNs sont précipités par ajout de 500 µL d'isopropanol (10 min à température ambiante) puis centrifugés 15 min à 12000 g et 4°C. Le culot d'ARNs est lavé à l'éthanol 70% puis séché et remis en suspension dans 50 µL d'eau distillée stérile. Les ARNs sont ensuite dosés à 260 nm (1 unité DO ⇔ 40 µg d'ARN/ml) puis stockés à -20°C.

II.VIII.2 Northern Blots

Aux volumes d'échantillons correspondant à 12 µg d'ARN sont ajoutés 1 volume de tampon de dénaturation et 0,5 volume de tampon de charge. Les ARNs sont dénaturés à 70°C (5 min), puis placés immédiatement dans la glace. Ils sont ensuite séparés suivant leur taille par électrophorèse dans un gel d'agarose dénaturant à 1,2%. Après migration, l'excès de Bet (bromure d'éthydiu) et de formaldéhyde est éliminé par rinçages successifs à l'eau distillée. Le transfert des ARNs sur membrane de nylon est réalisé sur la nuit par capillarité grâce à un flux de tampon 10 SSC. Les ARNs sont ensuite fixés sur la membrane par 'cross-linking' sous UV ('UV Stratalinker', Stratagène). La membrane est alors préhybridée 3 h minimum à 42°C dans le tampon d'hybridation, puis hybridée ensuite avec une sonde spécifique radio-marquée.

II.VIII.3 Préparation des sondes et hybridation

Les sondes employées sont les ADNc de l'isoforme de catalase *CAT2* de *Nicotiana glumbaginifolia* et *SOD2* de *Nicotiana sylvestris*.

Elles sont préparées à partir de bactéries contenant des plasmides possédant les séquences d'intérêt. L'ADN plasmidique est extrait des bactéries à l'aide d'un kit commercialisé par la société 'Qiagen'. Le protocole se décompose en trois étapes principales : (i) centrifugation du lysat bactérien et absorption de l'ADN sur matrice de silicagel, (ii) élimination des impuretés par lavage et (iii) élution de l'ADN plasmidique.

Afin d'extraire la bande d'ADNc insérée dans le plasmide, deux techniques ont été utilisées en fonction de la sonde : PCR avec les oligonucléotides Universal et Reverse; pour *CAT 2* (Willekens et al., 1994). Les produits de PCR sont ensuite testés par électrophorèse dans un gel d'agarose (0,8 %) contenant du Bet. Les bandes d'agarose contenant les fragments d'ADN d'intérêt sont découpées sous lumière UV à l'aide d'un scalpel et les ADN extraits de l'agarose d'après le protocole 'QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol' (Qiagen). L'ADN est ensuite testé sur gel en qualité et quantité par rapport au 'smart ladder' (Eurogentec).

Les sondes (50 ng) sont ensuite marquées au α -³²P dCTP, par recopiage aléatoire à l'aide du 'NonaPrimerKit' (Appligène). Après dénaturation (5 min à 100°C), la sonde est ajoutée au tampon d'hybridation contenant la membrane et l'hybridation est réalisée à 42°C, la nuit, sous

agitation. La membrane est ensuite rincée afin d'éliminer l'excès de sonde: 15 min à 42°C dans une solution 1 SSC, 0,1% SDS, 15 min à 59°C dans la même solution et 15 min à 59°C dans une solution 0,2 SSC, 0,1% SDS. La révélation est effectuée en plaçant la membrane à -80°C au contact d'un film autoradiographique.

II.IX Immunodétection de la Plastidial Terminal Oxydase (PTOX)

La composition des tampons, gels et solutions utilisés au cours des trois étapes décrites ci-dessous est donnée au niveau de la **figure 25**.

II.IX.1 Séparation électrophorétique des protéines en gel de polyacrylamide monodimensionnel, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide selon la technique Laemmli (Laemmli et al., 1970). Les protéines (10 µg de protéines par puits pour le gel test et 60 µg pour le gel transféré) sont additionnées de 50% de tampon de charge dénaturant (tampon SBLU 10X) puis sont dénaturées 5 min à 90°C, avant d'être chargées sur gel. Les protéines sont soumises à une électrophorèse d'environ 1 h à 150 V (dans un appareil Biorad) en présence d'un tampon de migration Tris-glycine-SDS pH 8,3 (**figure 25**). Les protéines migrent successivement dans un gel de concentration à 3% de polyacrylamide puis dans un gel de séparation à 12% (voir **figure 25**). Le SDS confère aux protéines une charge globale négative qui homogénéise les charges relatives des différentes protéines présentes dans l'échantillon. Dans le champ électrique, les protéines sont donc séparées en fonction de leur masse moléculaire et non de leur charge électrique. Un marqueur de taille *Molecular Weight Marker VI* (Sigma) est utilisé. Le gel test (gel non transféré, pour tester les quantités relatives de protéines) est coloré pendant au moins 1 h dans une solution de bleu de Coomassie, puis décoloré dans un mélange acide acétique-méthanol-eau. Le gel utilisé pour le transfert et l'analyse western n'est pas coloré et utilisé immédiatement après électrophorèse pour le Western Blot.

II.IX.2 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Après séparation en gel de polyacrylamide, les protéines sont électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose (Sigma) dans un appareil de transfert (Biorad) en présence d'un

tampon Tris-glycine-méthanol (**figure 25**), pendant 1 h 30 min à 100 V, 300 mA et à 4°C. Dans cet appareil, le gel est placé côté anode et la membrane côté cathode. Les protéines, entraînées par le courant électrique vont sortir du gel et se fixer sur la membrane. Gel et membrane sont pris en sandwich entre deux papiers Whatmann 3M et deux mousses protectrices. Le gel est coloré au bleu de Coomassie afin de vérifier l'efficacité du transfert.

II.IX.3 Révélation immunologique

A la fin du transfert, la membrane est récupérée et placée dans une solution de saturation contenant des protéines de lait (ces protéines saturent les sites de fixations libres, cette étape est indispensable en vue d'une immunodétection, **figure 25**). La saturation est réalisée sous agitation pendant 45 min à température ambiante ou pendant une nuit à 4°C.

Après saturation, la membrane est rincée 3 fois successivement par des bains de 5 min dans un tampon de rinçage (**figure 25**), puis la membrane est incubée 3 à 4 h en présence de l'anticorps primaire utilisé à une concentration finale de 1/10000. Il s'agit d'un anticorps polyclonal ciblant la protéine PTOX d'*Arabidopsis thaliana* (Cournac et al., 2000). Après 5 rinçages de 10 min dans le tampon de rinçage, la membrane est mise en présence pendant 45 min de l'anticorps secondaire (anti Ig de lapin ou de souris couplé à la peroxydase HRP, suivant les caractéristiques du sérum primaire). La membrane est de nouveau rincée 3 fois 5 min dans la solution de rinçage, puis 2 fois 5 min dans une solution de rinçage finale. La réaction immunologique est réalisée par incubation de la membrane dans une solution de révélation puis stoppée par addition d'eau distillée. Le système de révélation utilise une réaction colorée entre la peroxydase et le substrat TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). La membrane est ensuite placée dans un sac plastique puis dans une cassette en présence d'un film autoradiographique. Le temps d'exposition du film est adapté en fonction du signal.

Des échantillons protéiques de feuilles de *Lycopersicon esculentum* transgéniques (Mill.) cv. Micro Tom (notés PTOX +), sur-exprimant le gène de la PTOX d'*Arabidopsis thaliana* ont été utilisés comme contrôle positif de cette expérience.

II.XI Peroxydation membranaire

Deux méthodes sont ici associées afin d'estimer la destruction des membranes cellulaires : la mesure de la conductivité membranaire et la quantification par dosages spectroscopiques du malondialdéhyde, intermédiaire de dégradation des lipides membranaires.

II.XI.1 Conductivité

Cette expérience consiste à mesurer le pourcentage de conductivité qui est proportionnel à la concentration de molécules chargées, sorties des cellules détruites et présentes dans le bain (Hincha, 1994). Elle nous renseignera sur le taux de destruction membranaire.

Pour cette expérience, nous disposons d'un conductimètre délivrant les mesures en μ Siemens (il est important de faire attention à la température et au volume). Après les avoir rincés à l'eau distillée, deux disques foliaires sont placés dans 10 mL d'eau distillée dans une boîte de Pétri, puis agiter pendant 24 h. La conductivité est lue une première fois. Le mélange eau et disques foliaires est ensuite placé 10 min à 95°C pour obtenir une destruction totale des membranes. Nous obtenons, ainsi, la conductivité totale, deuxième mesure de conductivité lue après retour du mélange à la température de la pièce. Les résultats sont exprimés en pourcentage, selon la formule ci-dessous:

$$\% = \text{conductivité} \times 100 / \text{conductivité totale}$$

II.XI.2 Dosages du malondialdéhyde

Afin d'étudier la peroxydation lipidique, nous avons entrepris le dosage du MDA (Malondialdéhyde, produit de dégradation des membranes lipidiques, Hodges et al., 1999).

Deux disques foliaires sont broyés à température ambiante avec du sable et de l'éthanol 80%, afin d'obtenir un volume total de 5 mL (solution et sable compris). Le tout est vortexé puis centrifugé 10 min à 3000 g. 1 mL de surnageant est placé dans un tube contenant 1 mL d'une solution composée de 0,001% BHT (butylated hydroxytoluène) et de 20% TCA (acide trichloroacétique). 1 mL de surnageant est placé dans un deuxième tube contenant 1 mL d'une solution composée de 0,001% BHT, 20% TCA et 0,065% TBA (acide thiobarbiturique). Les deux tubes sont chauffés 25 min à 95°C puis centrifugés 10 min à 3000 g.

Trois mesures sont réalisées au spectrophotomètre à 3 longueurs d'ondes: 440 nm (mesure de la concentration en saccharose), 532 nm (mesure de la concentration en saccharose et en complexe TBA-MDA) et 600 nm (mesure de l'absorbance provoquée par des impuretés). Le blanc est réalisé avec de l'eau distillée.

Les résultats sont obtenus à l'aide des calculs ci-dessous:

$$X = [(A532+TBA) - (A600+TBA)] - [(A532-TBA) - (A600-TBA)]$$

$$Y = [(A440+TBA) - (A600+TBA)] \times 0,0571$$

$$\text{MDA (nmol /mL)} = (X - Y / 157\ 000) \times 10^6$$

III. Traitements expérimentaux

III.I Définition de l'état constitutif

Les prélèvements sont réalisés le matin (entre 9 et 10 h) au niveau des parties vertes des premières feuilles matures.

III.II Expérimentations et dispositifs expérimentaux

Les plantes seront utilisées au cours de cette étude sous trois formes: feuilles attachées à la plante, feuilles détachées ou disques foliaires. Différentes techniques et expérimentations ont été mises en œuvre afin de répondre aux objectifs de notre étude définis précédemment. Elles sont présentées ci-dessous accompagnées de leur principe.

III.II.1 Echanges gazeux foliaires

Ces mesures se font via le LiCor 6400 (*figure 19A*). Il est constitué d'une pince où l'on va placer la feuille (pour une surface d'échange de 2 cm²), qui contient la source lumineuse et les capteurs qui vont mesurer, entre autres, l'assimilation du CO₂. Ces capteurs sont reliés à une unité qui contient un processeur, qui centralise les informations sur un écran.

Un autre dispositif de mesures des échanges gazeux foliaires a été utilisé (*figure 19B*).

III.II.2 Fluorescence chlorophyllienne

Chacun des deux appareillages de mesure des échanges gazeux foliaires est associé à un dispositif de détermination de la fluorescence chlorophyllienne (*figure 20*). Notons que deux fluorimètres portables seront utilisés au cours de cette étude, le Mini-PAM et le PAM 2000.

III.II.3 Croissance des plantes sous fort CO₂

Un dispositif de chambres de culture présent dans les serres associées au laboratoire a été mis à profit pour cette expérience (voir *figure 26*). L'objectif est de savoir si une période, même courte sous fort CO₂, permet au CMSII de compenser une partie de son retard de croissance et de son défaut d'assimilation par rapport au WT cultivé dans les mêmes conditions.

Des plantes WT et CMSII âgées d'environ 1 mois sont placées dans six chambres dont les conditions en termes de CO₂, température et luminosité sont contrôlées et suivies de façon continue. Deux conditions expérimentales recouvrant chacune trois chambres sont définies, avec comme seule variable, la concentration en CO₂, qui sera soit de 400 ppm, soit de 1000 ppm (+/- 10%). L'intensité lumineuse incidente, sa photopériode et la température jour/nuit sont maintenues respectivement à 150 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 16 h de jour et 23°C/15°C tout au long de l'expérience. Huit à neuf plantes sont placées dans chaque chambre. La répartition des plantes est identique pour les deux conditions expérimentales, à savoir une chambre contenant que des plantes WT, une deuxième chambre ne contenant que des plantes CMSII et une troisième chambre contenant pour moitié des plantes WT et pour moitié des plantes CMSII.

Tous les six jours, le nombre de feuilles ainsi que leurs largeurs et longueurs sont mesurés. A la fin de l'expérience, c'est à dire après six semaines de traitement, l'activité Glycolate Oxydase et une courbe de réponse de l'assimilation nette de CO₂ à la lumière sont réalisées.

III.II.4 Application d'un stress lumineux seul et en combinaison avec une basse température ou un herbicide

Le dispositif mis au point au cours de cette thèse est décrit au niveau de la *figure 27* ci-contre. Il consiste à associer un bac inox balayé par un circuit d'eau provenant d'un bain thermostaté, à un système d'ampoules halogènes froides réglable en hauteur permettant d'obtenir un éclairage homogène de 1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sur une surface de 200 cm² environ. L'objectif d'un tel dispositif est d'étudier les effets d'une part d'un herbicide (le méthylviologène) associé à de forts éclairages, et d'autre part d'une contrainte "basses températures" associée ou non à de forts éclairages sur des plantes WT et CMSII cultivées sous deux intensités lumineuses incidentes (80 et 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Différents traitements expérimentaux seront donc réalisés sur des disques foliaires incubés dans des boîtes de Pétri, soit dans de l'eau distillée soit dans une solution de méthylviologène (MV) de concentration donnée:

	obscurité	faible lumière (100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{PAR}$)	forte lumière (1000 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{PAR}$)	Obscurité + 1 mM MV	forte lumière + MV (1000 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{PAR}$)
T°C ambiante (20°C +/- 3°C)	✓		✓	✓	✓
T°C basse (5°C +/- 2°C)	✓	✓	✓		

Ces traitements expérimentaux consisteront en des cinétiques (1 à 9 h toutes les heures, puis 24 h voire 48 h) d'évolution de paramètres liés à la fluorescence chlorophyllienne (F_v/F_m), du contenu en pigments (chlorophylles et caroténoïdes), de l'activité catalase et de la perméabilité membranaire (conductivité et/ou contenu en malondialdéhyde). Pour les traitements au MV, les évolutions des activités SOD ont été également suivies.

L'ensemble de ces traitements a été répété en présence d'inhibiteurs, la lincomycine (3 mM, inhibant la synthèse des protéines chloroplastiques et mitochondriales) et la cycloheximide (35 μM , inhibant la synthèse de protéines nucléaires). Un suivi du rapport F_v/F_m dans le premier cas ainsi qu'un suivi de l'activité catalase dans le second, ont été réalisés.

III.II.5 Expérience de récupération

L'objectif est de tester si, après application d'un stress froid associé à de forts éclaircements, les plantes WT et CMSII cultivées sous 80 et 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sont capables de récupérer sous différentes conditions de température (ambiante ou sur la glace) de lumière (obscurité, 10, 80 et 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et en présence ou non d'inhibiteurs de la synthèse protéique (lincomycine). Le paramètre choisi pour la récupération est le rendement quantique maximum du PS II, F_v/F_m , paramètre facile à mesurer et caractérisé comme l'une des premières cibles d'un stress lumineux (voir Introduction). La contrainte associant une très basse température et une très forte intensité lumineuse est appliquée via le dispositif décrit dans les paragraphes précédents (**figure 27**). La durée d'application de cette contrainte est choisie pour obtenir, quel que soit le génotype et les conditions de croissance des plantes, une inhibition de l'ordre de 50% du rapport F_v/F_m . La cinétique de récupération consiste en une mesure du rapport F_v/F_m via un fluorimètre portable (Mini-PAM) après 15, 30 min, 1 h puis toutes les heures jusqu'à 7 h post-stress. Chaque mesure est effectuée sur un disque foliaire différent placé au préalable 30 min à l'obscurité.

IV. Analyses statistiques

Lorsque cela n'est pas mentionné de façon spécifique, chaque expérimentation a été réalisée au minimum trois fois et les erreurs standards sont données. Les analyses statistiques, basées sur des tests de type ANOVA ont été réalisées à l'aide du logiciel STATISTICA (STATSOFT Inc., Tulsa, USA). Le niveau de significativité des différences observées a été fixé à $p < 0,05$.

Acclimatation à l'intensité lumineuse de croissance

I. Résultats

I.I Contexte

Un élément préalable au présent travail a été la mise au point de conditions de croissance contrôlées, visant à minimiser les sources de variabilités rencontrées jusqu'alors. La réflexion sur la nature de ces conditions de culture s'est basée sur un résultat obtenu au laboratoire et confirmé par la suite : l'assimilation nette de CO₂ est plus faible chez les plantes CMSII que chez les WT sous conditions normales en CO₂ et O₂ et différentes intensités lumineuses incidentes (Sabar et al., 2000 ; Dutilleul et al., 2003a). Dès lors, dans le but d'étudier les mécanismes d'interaction entre mitochondries et chloroplastes et d'identifier le(s) facteur(s) inhibant la photosynthèse chez le mutant CMSII, la question s'est posée de savoir s'il existait des conditions de croissance pour lesquelles cette différence d'assimilation serait exacerbée ou au contraire minimisée, voire absente. C'est pourquoi, la culture des plantes WT et CMSII sous cinq niveaux lumineux (80, 150, 200, 250 et 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a été réalisée.

I.II Acclimatation à l'intensité lumineuse de croissance

I.II.1 Résultats préliminaires

Pour répondre à la question posée ci-dessus, nous avons réalisé des courbes de réponse de l'assimilation nette de CO₂ à l'intensité lumineuse incidente sur les plantes WT et CMSII de *Nicotiana sylvestris* cultivées sous les cinq niveaux lumineux (**figure 28**).

Des différences sont à noter selon les conditions de croissance (intensités lumineuses incidentes) et le génotype (WT et CMSII). En s'en tenant à l'allure générale des courbes et en s'intéressant en particulier aux valeurs obtenues aux forts éclairagements, l'augmentation de l'intensité lumineuse de croissance induit une augmentation de $A_n \text{ max}$ des plantes WT et CMSII, cette augmentation se révélant toutefois très faible chez les plantes CMSII (**figure 28A**). Cette observation nous permet d'isoler deux intensités lumineuses de croissance :

- **80 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$** , pour laquelle les plantes WT et CMSII (notées par la suite WT 80 et CMS 80) ont une $A_n \text{ max}$ comparable, autour de $12 \mu\text{moles CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$;
- **350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$** (WT 350 et CMS 350), pour laquelle $A_n \text{ max}$ est augmentée pour les deux génotypes WT et CMSII, mais de façon nettement plus marquée chez le WT (respectivement de 67% et 17%, voir **figure 28B**).

I.II.2 Croissance et structure foliaires

I.II.2.a Croissance

L'application d'une intensité lumineuse incidente supérieure ($350 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ au lieu de 80) depuis la germination induit une nette accélération de la croissance des plantes WT et CMSII de *Nicotiana sylvestris*. Ceci s'observe toutefois de façon un peu plus marquée chez les plantes WT pour lesquelles l'âge des plantes de stade rosette 6-8 feuilles est presque divisé de moitié (du tiers pour le CMSII) lorsqu'elles sont cultivées sous $350 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ au lieu de $80 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (respectivement de 6-9 semaines au lieu de 12-15 pour les plantes WT contre 10-12 semaines au lieu de 15-18 pour les plantes CMSII ; voir **tableau I**). De façon remarquable, les plantes CMSII montrent un retard de croissance quelle que soit l'intensité lumineuse de croissance comparativement aux plantes WT cultivées dans les mêmes conditions (de l'ordre de 25% sous faible éclairage et 33% sous fort éclairage).

I.II.2.b Structure et propriétés optiques des feuilles

Chez les plantes WT 350, la surface de la première feuille mature et cette même surface rapportée par unité de poids frais (LSA, Leaf Specific Area) sont inférieures à celles obtenues chez les plantes WT 80 (**tableau I**). Il en est de même concernant le LSA chez les CMSII mais pas pour la surface foliaire restant identique quelles que soient les conditions lumineuses de croissance (**tableau I**). Le contenu en protéines solubles totales, exprimé par unité de surface foliaire, est plus élevé chez les plantes cultivées sous $350 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ par rapport aux plantes $80 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (WT et CMSII), mais également chez les plantes CMSII par rapport aux plantes WT cultivées dans les mêmes conditions (**tableau I**).

En revanche, les propriétés d'absorption dans les longueurs dites photosynthétiquement actives (PAR : 400 à 700 nm) semblent peu affectées par l'intensité lumineuse de croissance ou par le génotype WT/CMSII des plantes. En effet, des spectres d'absorbance, transmittance et réflectance sont réalisés dans les longueurs d'ondes du visible sur les premières feuilles matures des plantes WT et CMSII cultivées sous 80 et $350 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (**figure 29**). Les allures des courbes sont proches, mais révèlent une absorbance moyenne des feuilles plus élevée chez les plantes WT 350, intermédiaire pour les plantes WT 80 et CMS 350, et plus

faible chez les plantes CMS 80 (tableau B de la **figure 29**). Ces valeurs seront utilisées afin de corriger les données de sortie du LiCor 6400-40, qui attribue par défaut une valeur de 0,85.

1.II.3 Propriétés de l'appareil photosynthétique

La photosynthèse est ici considérée comme un ensemble couvrant les étapes d'absorption de la lumière incidente (contenu qualitatif et quantitatif en pigments des feuilles) ainsi que les réactions primaires puis secondaires (flux d'électrons, fluorescence chlorophyllienne, assimilation nette de CO₂ et activités enzymatiques). Ces paramètres ont été explorés chez les quatre types de plantes définis précédemment : WT 80, CMS 80, WT 350 et CMS 350.

1.II.3.a Assimilation nette de CO₂ : A_n

Comme nous l'avons vu précédemment, les courbes de réponses de l'assimilation nette de CO₂ démontrent une acclimatation marquée à l'éclairement incident de croissance chez le WT (**figure 28B**). En effet, les plantes WT 350 présentent une A_n supérieure pour des éclairagements incidents dépassant 250 μmoles PAR m⁻² s⁻¹ (**figure 28B**), mais également un point de compensation pour la lumière (PCL) et une pente à l'origine (définissant, sur une base de lumière incidente, le rendement quantique apparent de l'assimilation : RQA) significativement plus élevés que pour les plantes WT 80 (**tableau I**).

En revanche, ces variations sont très peu marquées chez le mutant CMSII lorsque l'on compare les plantes CMS 350 aux plantes CMS 80 (**figures 28B et tableau I**), suggérant un défaut d'acclimatation vis-à-vis de l'intensité lumineuse de croissance chez les plantes CMSII. En effet, en comparant les plantes WT et CMS cultivées dans les mêmes conditions, l'assimilation nette de CO₂ est identique lorsque ces plantes sont cultivées sous faible éclairage et inférieure chez les CMSII lorsqu'elles sont cultivées sous plus fort éclairage. Les plantes CMS 350 ont un PCL supérieur et un RQA inférieur à ceux des plantes WT 350 mettant en avant une moins bonne efficacité d'utilisation de la lumière dans ces conditions.

1.II.3.b Contenu en pigments chlorophylliens

Le contenu en pigments chlorophylliens, présenté dans le tableau du **tableau I** confirme ce défaut d'acclimatation des plantes CMSII. Le contenu total en chlorophylles exprimé par unité de surface et le rapport chlorophylles a/b augmentent chez les plantes WT 350

comparativement aux plantes WT 80. Ces paramètres sont identiques chez les plantes CMSII quelles que soient leurs conditions de croissance et présentent des valeurs intermédiaires à celles observées chez les WT 80 et WT 350.

1.II.3.c Réactions primaires de la photosynthèse

Afin de savoir si le défaut d'acclimatation à l'intensité lumineuse de croissance se manifeste au niveau des réactions primaires de la photosynthèse, des courbes de réponse du rendement quantique d'assimilation de CO₂ (Φ_{CO_2}) et du PS II (Φ_{PSII}) à l'intensité lumineuse incidente ont été réalisées. Les résultats sont présentés sous la forme de courbes représentant Φ_{PSII} en fonction de Φ_{CO_2} (**figure 30**).

Sous conditions normales (21% O₂ et 380 ppm CO₂), **15 photons** sont utilisés pour l'assimilation d'une molécule de CO₂ pour les plantes WT 80, WT 350 et CMS 80 contre **23 photons** pour le CMS 350 (**figure 30 A**). Les mesures ont été répétées dans une atmosphère très appauvrie en O₂, l'oxygène étant un accepteur d'électrons important via différentes voies métaboliques dont la photorespiration. Il en résulte que sous très faible teneur en O₂, environ **9 photons** sont nécessaires à l'assimilation d'une molécule de CO₂ pour l'ensemble des plantes étudiées, quels que soient leur génotype et leur condition de croissance (**figure 30 B**). La relation obtenue **figure 30B** ne montre de dysfonctionnement ni du PS II, ni des réactions primaires sous l'effet des différentes intensités lumineuses de croissance.

Cette relation sera utilisée pour recalculer le transport électronique linéaire total le long de la chaîne photosynthétique (ETR) en conditions normales (CO₂ et O₂ ambiants), comme décrit par Ghashghaie et Cornic (1994). Les résultats sont décrits sur la **figure 31**. Ainsi, l'ETR se révèle supérieur lorsque les plantes WT et CMSII sont cultivées sous plus fort éclaircissement mais peu de différences sont notées entre les plantes WT et CMSII cultivées sous les mêmes conditions (**figure 31A**).

D'autre part, si nous comparons ce transport électronique à A_n mesurée en parallèle, nous pouvons noter qu'il lui est supérieur pour l'ensemble des conditions étudiées, quelles que soient les plantes et leurs conditions de croissance. Cet excès d'électrons, c'est-à-dire les électrons non consommés par A_n et la respiration à la lumière, R_d (excès ETR= ETR-($4A_n+R_d$)), est supérieur chez le CMS 350 par rapport au WT 350 alors qu'il est comparable entre les plantes WT et CMSII cultivées sous 80 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**figure 31B**). Ce résultat, mis en commun avec la relation présentée sur la **figure 30A**, indiquerait l'existence

d'un ou de plusieurs puits supplémentaires, utilisant préférentiellement l'oxygène, pour les électrons chez les plantes CMS 350.

Enfin, un troisième paramètre est utilisé comme indicateur des réactions primaires de la photosynthèse. Il s'agit du quenching photochimique, **qP**, qui représente la part de dissipation de l'énergie dévolue à la photochimie. Comme décrit au niveau de la **figure 31C**, les courbes de réponse de qP à l'éclairement incident ne montrent pas de différences importantes entre les plantes WT et CMSII cultivées dans les mêmes conditions, en accord avec les mesures d'ETR. Ceci confirme que les réactions primaires ne sont pas affectées chez le CMSII lorsqu'il est cultivé sous plus fort éclairement. Le défaut d'acclimatation vis-à-vis de la lumière de croissance observé chez le CMSII pourrait donc se situer en aval, au niveau des réactions secondaires de la photosynthèse.

1.II.3.d Réactions secondaires de la photosynthèse

Deux enzymes clés ont été étudiées pour rendre compte des réactions secondaires de la photosynthèse : la **Rubisco** et la **Saccharose Phosphate Synthase (SPS)**.

La stimulation des activités initiales Rubisco et SPS par une croissance sous plus forte intensité lumineuse (c'est-à-dire lorsque l'on compare les activités de plantes cultivées sous 350 à celles de plantes cultivées sous 80 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$) est réduite chez le CMSII par rapport au WT (**tableau II**). Ceci montre un défaut d'acclimatation de l'activation de ces enzymes à l'intensité lumineuse de croissance chez les plantes CMSII. Toutefois, les activités maximales de ces enzymes sont semblables chez les plantes WT et CMSII cultivées dans les mêmes conditions, et sont supérieures chez les plantes cultivées sous plus fort éclairement (**tableau II**), démontrant que les capacités de ces enzymes ne sont pas altérées chez les plantes CMSII.

1.II.4 Réversibilité de l'acclimatation

La réversibilité de l'acclimatation à la lumière de croissance a été étudiée en plaçant des plantes WT et CMSII cultivées sous fort éclairement à faible éclairement et inversement. A_n , la respiration mitochondriale à l'obscurité, R_n , le transport électronique linéaire

chloroplastique, ETR, le quenching photochimique qP et les activités initiales et maximales de la Rubisco et de la NADP-MDH ont été mesurés après 3 et 7 jours (*figure 32*).

Les résultats obtenus montrent que la plupart des paramètres étudiés s'acclimatent aux nouvelles conditions très rapidement au cours de la période d'étude en atteignant des valeurs caractéristiques de plantes cultivées dès les semis dans ces conditions (*figure 32*). Très peu de différences apparaissent entre les réponses des plantes WT et CMSII. Seul l'ajustement des activités initiales Rubisco et NADP-MDH semble perturbé chez le CMSII.

1.II.5 Acclimatation et régulation rédox

Trois caractéristiques des plantes CMS 350 mesurées précédemment pourraient suggérer l'implication de signaux rédox chloroplastiques dans la mise en place de l'acclimatation à l'intensité lumineuse incidente :

- un transport électronique dans les chloroplastes (principaux responsables de la production de Formes Actives de l'Oxygène (FAO) chez les plantes à la lumière) en excès comparativement aux plantes WT 350,
- un contenu quantitatif et qualitatif en chlorophylles différent,
- un ajustement perturbé des activités initiales Rubisco et NADP-MDH lors des transitions en condition de faible/forte luminosité.

L'état rédox dans les chloroplastes a été étudié à deux niveaux : (i) l'état de réduction des quinones Q_A (premiers accepteurs des électrons provenant du PS II), utilisé ici comme indicateur de l'état rédox de la chaîne de transport des électrons photosynthétiques, et (ii) l'activité NADP-MDH, utilisée comme indicateur de l'état rédox du stroma. L'activité NADP-MDH est étudiée également comme possible puits pour les électrons via la valve malate en faveur de la respiration mitochondriale.

L'état de réduction des quinones, estimé à 1-qP, est identique pour les plantes WT et CMSII cultivées dans les mêmes conditions (*figure 31C*).

L'activité NADP-MDH a été estimée après 1 h de photopériode (activité « constitutive ») ou après 3 h sous 1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*tableau III*). L'activité initiale constitutive de

l'enzyme est plus élevée chez les plantes CMS 80 et identique pour les trois autres types de plantes : WT 80, WT 350 et CMS 350 (*tableau III*). L'activité maximale constitutive quant à elle, est plus élevée pour les WT 350, intermédiaire chez les CMS 80 et CMS 350 et la plus faible chez les WT 80 (*tableau III*). Ainsi, l'état d'activation constitutif de l'enzyme est proche pour les plantes WT et CMSII cultivées dans les mêmes conditions (autour de 60% pour les plantes cultivées sous faible éclairement et 40% pour les plantes cultivées sous plus fort éclairement). Après 3 h d'exposition à un très fort éclairement, l'activité initiale de l'enzyme augmente fortement chez les plantes WT 80 et WT 350, alors qu'elle ne change pas pour les plantes CMSII (*tableau III*). Les activités maximales ne sont quant à elles pas affectées par ce traitement lumineux.

L'état rédox du pool de plastoquinones et les niveaux constitutifs des activités initiales et maximales de la NADP-MDH ne semblent donc pas impliqués dans les différences observées entre les plantes WT 350 et CMS 350.

I.III Limitation de l'assimilation nette de CO₂ et consommation des électrons chez le CMS 350

I.III.1 Respiration à l'obscurité et à la lumière

La respiration mitochondriale à l'obscurité a été mesurée par l'évolution du dégagement de CO₂ (*tableau IV*). Les plantes CMSII présentent un niveau de respiration à l'obscurité 20% supérieur à celui des plantes WT lorsqu'elles sont cultivées sous 80 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$, et 30% supérieur lorsqu'elles sont cultivées sous 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*tableau IV*). Une respiration plus forte chez les plantes CMSII à la lumière pourrait participer à la plus faible assimilation nette de CO₂ mesurée chez les plantes CMS 350 comparativement aux plantes WT 350.

La respiration mitochondriale à la lumière, R_d , a été calculée en se basant sur la méthode de Laisk (1977). Trois courbes de réponses de l'assimilation nette de CO₂ à de faibles c_i ont été réalisées pour trois éclairements incidents (*tableau IV*). Pour une condition de croissance donnée, aucune différence n'est notée entre les plantes WT et CMSII. La respiration à la lumière ne contribue donc pas à la limitation de la photosynthèse chez le CMS 350.

1.III.2 Courbes de réponses à la concentration en CO₂

Pour savoir si la photorespiration contribue à la plus faible assimilation nette obtenue chez les CMS 350 comparativement aux WT 350, les courbes de réponses de l'assimilation nette de CO₂ et de la fluorescence chlorophyllienne à la concentration en CO₂ incidente ont été réalisées sous 800 μmoles PAR m⁻² s⁻¹ (**figure 33A** page suivante).

L'assimilation nette A_n obtenue à de faibles c_i (inférieurs à 500 ppm) est plus élevée chez les plantes WT que chez les plantes CMSII quelles que soient leurs conditions de croissance. Cette différence disparaît aux plus forts c_i , A_n atteignant une valeur proche de 26 μmoles CO₂ m⁻² s⁻¹ pour les plantes WT 350 et CMS 350 et de 16 μmoles CO₂ m⁻² s⁻¹ pour les plantes WT 80 et CMS 80. Ces résultats sont confirmés par les mesures de dégagement d'oxygène via l'électrode à oxygène effectuées sous un éclairage non limitant (800 μmoles PAR m⁻² s⁻¹) et une pression partielle en CO₂ saturante (> 3%) à température ambiante. En effet, dans ces conditions, les activités photosynthétiques des plantes mutantes et sauvages sont proches des valeurs données ci-dessus à partir des courbes $A_n=f(c_i)$ (**figure 33B**).

La croissance des plantes sous plus fort éclairage induit une saturation de A_n pour de plus fortes valeurs de c_i (autour de 1000 ppm, contre 600 pour WT 80 et CMS 80), ceci étant en accord avec les activités maximales Rubisco et SPS plus élevées mesurées chez ces plantes.

Nous remarquons que le rapport $ETR/(A_n+R_d)$ des plantes WT 350 et CMS 350 est maximal aux très faibles c_i et supérieur pour les plantes CMS 350 jusqu'à un c_i proche de 500 ppm (**figure 33C**). Pour des c_i supérieurs, cette différence disparaît, suggérant un transport d'électrons vers la photorespiration favorisé chez le CMS 350.

1.III.3 Courbes de réponses à la concentration en O₂

Les courbes de réponses de l' A_n et de la fluorescence chlorophyllienne à l'intensité lumineuse et à la concentration en CO₂ incidentes ont été également réalisées sous une atmosphère très appauvrie en O₂. L'ensemble des voies métaboliques utilisant l'oxygène, dont la photorespiration mais aussi la réaction de Mehler ou la chlororespiration, est ainsi supprimé (**figures 33D et 34**).

L'assimilation nette de CO₂, A_n , augmente chez les plantes WT et CMSII dans une atmosphère appauvrie en O₂, à la fois pour les courbes A_n/CO_2 (**figure 33D**) ou $A_n/lumière$

(*figure 34* page suivante). La stimulation de l' A_n par une atmosphère appauvrie en O_2 est plus marquée pour les plantes CMSII que pour les plantes WT cultivées sous faible ou plus fort éclairement (*figure 34*). La différence d' A_n observée entre les plantes WT 350 et CMS 350 (*figure 28*) ainsi que l'excès d'électrons chez le CMS 350 (non consommé par la photochimie : *figure 31B*) sous atmosphère ambiante sont réduits sous faible O_2 associé à de forts éclairements et/ou de fortes concentrations en CO_2 (*figures 33C et 34*). Ces résultats montrent que l' O_2 constitue l'accepteur majeur des électrons en excès chez le CMS 350, mais ne permettent pas de quantifier les implications éventuelles des différentes voies possibles.

1.III.4 Chlororespiration et photorespiration

Hormis l'activité de la valve malate (estimée par l'activité NADP-MDH) et la respiration mitochondriale à la lumière, trois autres puits potentiels pour les électrons de la chaîne photosynthétique qui pourraient affecter le niveau de l'assimilation carbonée chez le CMS 350, ont été envisagés : la chlororespiration (via la Plastidial Terminal Oxydase : PTOX, *figure 35*), la réaction de Mehler (NADP-MDH) et la photorespiration (*figure 36*).

Le contenu en protéines PTOX estimé par Western Blot est très proche entre les plantes WT 350 et CMS 350 et beaucoup plus faible que celui observé pour une tomate surexprimant la protéine (*figure 35*). Cela pourrait exclure l'implication de cette voie dans les différences d' A_n observées entre ces plantes. Néanmoins l'activité de l'enzyme n'a pas été mesurée.

La réaction de Mehler, non quantifiable directement, est ici discutée à partir de l'activité de la NADP-MDH. En effet, les électrons de la chaîne photosynthétique sont transférés à l'enzyme avant l' O_2 , donc en amont de la réaction de Mehler (Backhausen et al., 2000). Dans nos conditions, les résultats ne montrent pas de contribution significative de cette voie à la consommation de l'excès d'électrons chez le CMS 350.

Pour évaluer l'éventuelle contribution de la photorespiration, plusieurs éléments ont été pris en compte : l'activité de la Glycolate Oxydase (*figure 36*), les mesures d' A_n et de fluorescence chlorophyllienne en conditions non photorespiratoires (c'est-à-dire sous forte lumière et/ou fort CO_2 associé ou non à une faible concentration en O_2 incidente : *figures 33D et 34*). Tous ces éléments vont dans le sens d'une plus forte photorespiration chez les CMS 350 que chez les WT 350 et de façon moins marquée chez les plantes CMS 80 comparativement aux plantes WT 80. En effet, l'activité Glycolate Oxydase est plus importante chez les plantes CMSII que chez les plantes WT. D'autre part, la différence d' A_n

observée en conditions ambiantes en CO₂ et O₂ entre les plantes CMS 350 et WT 350, ainsi que l'excès d'électrons (non consommés par la photochimie) obtenu chez le CMS 350 disparaissent en conditions non photorespiratoires associant un très faible O₂ (< 0,5%), un fort CO₂ (jusqu'à 2000 ppm) et un fort éclaircissement (jusqu'à 2000 μmoles PAR m⁻² s⁻¹ : **figures 33A, 33C, 34, 36 et tableau IV**).

Ces résultats suggèrent donc que la photorespiration consomme la majorité des électrons en excès chez les plantes CMS 350. Deux facteurs principaux pourraient expliquer la plus forte photorespiration chez ces plantes : une plus faible disponibilité en CO₂ au niveau des chloroplastes et les propriétés intrinsèques de la Rubisco (facteur de spécificité, $S_{c/o}$, même si un changement du facteur de spécificité entre les plantes WT et CMSII apparaît peu vraisemblable). Ainsi ont été déterminés, d'une part, les limitations stomatiques et internes à la diffusion du CO₂ de l'atmosphère jusqu'aux chloroplastes, et d'autre part, le facteur de spécificité apparent de la Rubisco.

1.III.5 Limitation stomatique

La limitation stomatique calculée selon Farquhar et Sharkey (1982), comme décrit **figure 21**, est identique pour les plantes WT et CMSII cultivées dans les mêmes conditions, à savoir environ 25% pour les plantes cultivées sous 80 μmoles PAR m⁻² s⁻¹ et 16-17% pour les plantes cultivées sous 350 μmoles PAR m⁻² s⁻¹ (**tableau IV**).

Des empreintes stomatiques ont également été réalisées sur l'ensemble des plantes étudiées afin de déterminer l'indice stomatique (**tableau IV**). La croissance des plantes WT et CMSII sous plus fort éclaircissement induit une augmentation de l'indice stomatique (faces inférieures et supérieures des feuilles confondues). Cette augmentation est toutefois plus marquée chez les plantes CMSII, les plantes WT 350 et CMS 350 présentant des indices stomatiques très semblables. Par conséquent nous pouvons exclure l'hypothèse d'une limitation stomatique de l'assimilation nette de CO₂ chez le CMS 350.

1.III.6 Limitation interne

L'utilisation des isotopes stables du carbone a permis la détermination *in vivo* de la conductance interne du CO₂, g_m , comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes et

figure 23. Les résultats sont présentés **tableau IV**. Ils montrent une conductance interne deux fois plus faible chez les plantes CMS 350 que chez les plantes WT 350 (respectivement de 0,23 et 0,11 moles CO₂ m⁻² s⁻¹). Les plantes cultivées sous faible éclaircissement présentent une conductance interne comparable et proche de celle des plantes CMS 350 (**tableau IV**).

Dès lors, à partir de la formule $A_n = g_s (c_a - c_i) = g_m (c_i - c_c)$ avec les paramètres g_s (conductance stomatique) et c_i (concentration intercellulaire en CO₂) provenant des courbes $A_n=f(c_i)$, nous pouvons déterminer les concentrations chloroplastiques en CO₂, c_c , pour une pression partielle en CO₂ à l'extérieur c_a donnée. Ainsi, pour un c_a de 400 ppm, la fraction molaire de CO₂ au niveau des chloroplastes est d'environ 137 ppm des plantes CMS 350 contre 200 ppm pour les plantes WT 350.

La conductance interne vis-à-vis du CO₂ limite donc la concentration en CO₂ dans les chloroplastes chez le CMS 350, ce qui a pour conséquence une diminution de l'activité de carboxylation de l'enzyme Rubisco et une photorespiration accrue chez ces plantes.

I.III.7 Propriétés de la Rubisco

Les courbes de réponse $A_n=f(c_i)$, associées aux mesures de fluorescence chlorophyllienne, ont été mises à profit pour estimer certaines propriétés de la Rubisco.

I.III.7.a Facteur de spécificité apparent

Le facteur de spécificité apparent ($S_{app\ c_i}$) a été déterminé selon l'équation (28) à partir de la détermination expérimentale du paramètre c^* représentant la concentration intercellulaire (c_i) en CO₂ pour laquelle A_n compense la respiration mitochondriale à la lumière.

Un autre facteur de spécificité apparent a été déterminé, basé celui-ci sur Γ^* , concentration intrachloroplastique en CO₂ en absence de respiration mitochondriale ($S_{app\ c_c}$). La valeur Γ^* a été obtenue à partir de l'équation (27) et de la valeur c^* par extension des valeurs de respiration mitochondriale à la lumière, R_d et de conductance interne, g_m , mesurées expérimentalement sous une condition donnée : respectivement 380 et 400 ppm de CO₂.

Les résultats, présentés **tableau IV**, montrent des facteurs de spécificité apparent de la Rubisco très comparables pour l'ensemble des plantes étudiées : WT 80, CMS 80, WT 350 et CMS 350, et ceci que nous ayons pris en compte les concentrations intercellulaires ou

intrachloroplastique en CO₂ (respectivement $S_{app\ ci}$ et $S_{app\ cc}$). Les valeurs $S_{app\ cc}$ sont toutefois plus faibles, autour de 80 contre 90 pour les valeurs de $S_{app\ ci}$.

I.III.7.b Réactions de carboxylation et d'oxygénation : vitesses et flux d'électrons

Les rapports des vitesses de carboxylation et d'oxygénation de l'enzyme (V_c/V_o) ou des flux d'électrons dirigés vers l'une ou l'autre réaction (J_c/J_o) ont été déterminés à partir des équations (29) à (33) définies dans la partie 'Matériels et Méthodes'.

Les résultats sont présentés dans le **tableau IV**. Le rapport V_c/V_o , qu'il soit calculé à partir des valeurs de $S_{app\ ci}$ ou de $S_{app\ cc}$, est supérieur chez les plantes CMS 350 par rapport aux plantes WT 350. De même, le rapport des flux électroniques dirigés vers la carboxylation et l'oxygénation est supérieur chez les plantes CMS 350 par rapport aux WT 350 (**tableau IV**), renforçant l'hypothèse d'une plus forte photorespiration chez ces plantes CMS 350 par rapport aux plantes WT 350.

Deux expériences ont été conduites pour tester l'hypothèse de l'implication de la conductance interne, et par là même de la disponibilité en CO₂ dans les chloroplastes pour rendre compte des différences observées entre les plantes WT 350 et CMS 350.

I.IV Effets d'une exposition plus ou moins prolongée à différentes concentrations en CO₂

I.III.1 Croissance sous fort CO₂

Un suivi de l'accroissement du nombre de feuilles tout au long de l'expérience ainsi que des mesures d' A_n en fonction de l'éclairement incident et des mesures d'activité Glycolate Oxydase en fin d'expérience ont été réalisés sur des plantes WT et CMSII âgées de 1 mois, placées six semaines sous 150 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et à deux concentrations en CO₂ : 400 et 1000 $\pm 10\%$ ppm (**figure 37**). Les résultats obtenus confirment une croissance plus lente (mesurée en terme d'accroissement du nombre de feuilles journalier) ainsi qu'une plus faible activité photosynthétique (sous lumière saturante : $A_n\ max$) chez les plantes CMSII par rapport aux plantes WT lorsqu'elles sont placées sous CO₂ de 400 ppm (**figure 37** : respectivement de 0,1115 feuilles/jour et de 10,76 $\mu\text{moles CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour les CMSII contre 0,1856 et 12,28

pour les WT). Pour les plantes WT et CMSII placées sous fort CO₂, l'écart diminue (c'est le cas de la vitesse de croissance), voire s'annule concernant l' A_n (les deux plantes présentant une $A_{n\ max}$ autour de 13 $\mu\text{moles CO}_2\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$: **figure 37**). L'activité Glycolate Oxydase est plus faible chez les plantes WT et CMSII placées sous fort CO₂ par rapport aux plantes placées sous 400 ppm, mais plus élevée chez les plantes CMSII que chez le WT quelle que soit la concentration en CO₂. Ceci montre que l'activité de cette enzyme répond à l'activité photorespiratoire (inhibée sous fort CO₂) et va dans le sens d'une photorespiration plus importante chez les plantes CMSII.

1.III.2 Dépendance de l'assimilation nette et de l'activité Rubisco vis à vis de c_c

La corrélation observée jusqu'alors entre la plus faible A_n , la plus faible activité initiale Rubisco et la plus faible conductance interne (g_m) chez les CMS 350 comparativement aux WT 350, a été étudiée expérimentalement en soumettant ces plantes 1 h sous 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ à une concentration en CO₂ de l'air ambiant, c_a , calculée pour obtenir une concentration en CO₂ dans les chloroplastes, c_c , comparable à celles de plantes soumises à un c_a de 400 ppm. Ainsi, les plantes WT 350 ont été soumises à une concentration c_a de 280 ppm (pour un c_c attendu de 137 ppm, équivalent à celui de plantes CMS 350 soumises à un c_a de 400 ppm) et les plantes CMS 350 à un c_a de 510 ppm (pour un c_c attendu de 200 ppm équivalent à celui de plantes WT 350 soumises à un c_a de 400 ppm). Les activités initiales et maximales de la Rubisco ainsi que l' A_n ont été déterminées (**figure 37**). L'activité initiale Rubisco et l' A_n augmentent chez les plantes CMS 350 soumises à un plus fort c_a et diminuent pour les plantes WT 350 soumises à plus faible c_a (**figure 37**). Les activités totales Rubisco ne sont, quant à elles, pas affectées. Au final, les plantes WT 350 et CMS 350 traitées pour un même c_c présentent des activités initiales Rubisco et des niveaux d'assimilation similaires.

Acclimatation à l'intensité lumineuse de croissance

II. Discussion - Conclusions

II.I Acclimatation de l'appareil photosynthétique à l'intensité lumineuse de croissance

II.I.1 Non ajustement de l'assimilation nette chez le CMSII cultivé sous fort éclairage

La mutation provoque une croissance plus lente chez les plantes CMSII pour l'ensemble de nos conditions d'étude. Les résultats précédents ont suggéré que cette différence observée entre les plantes WT et CMSII met en jeu non seulement le fonctionnement mitochondrial, mais également le fonctionnement des chloroplastes. En effet, si une différence d'assimilation nette de CO₂, A_n , entre les plantes CMSII et les plantes WT cultivées dans les mêmes conditions avait déjà été obtenue au cours d'études précédentes (Sabar et al., 2000; Dutilleul et al., 2003a), il apparaît clairement dans notre étude qu'elle est dépendante de l'intensité lumineuse de croissance des plantes, cette différence d'assimilation nette de CO₂ n'existant plus lorsque les plantes sont cultivées sous très faible éclairage (80 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$). L'interaction entre les fonctionnements mitochondriaux et chloroplastiques apparaît donc primordiale pour l'acclimatation à une plus forte intensité lumineuse de croissance chez *Nicotiana sylvestris*. La suite de ce travail a consisté à identifier de(s) étape(s) de la photosynthèse potentiellement affectée(s) chez le CMSII au cours de l'acclimatation à une plus forte intensité lumineuse de croissance.

II.I.2 Acclimatation chez le WT de Nicotiana sylvestris

Les augmentations (1) du LSA, reflétant une plus grande épaisseur des feuilles confirmée par l'observation au microscope électronique de coupes transversales de feuilles, (2) des contenus en protéines solubles et en chlorophylles totales exprimés par unité de surface foliaire, (3) du rapport chlorophylles a/b, (4) de l'assimilation nette de CO₂ mesurée à lumière saturante ($A_{n\text{max}}$), (5) du transport électronique linéaire chloroplastique total, ETR, (6) de l'activité initiale et de la capacité de la Rubisco et de la SPS, ou encore (7) de la vitesse de croissance observées chez les plantes WT 350 comparativement aux plantes WT 80, constituent autant de réponses dites classiques de plantes cultivées sous un plus fort éclairage (de la Torre et Burkey, 1990a, 1990b ; Bailey et al., 2001; Evans et Poorter, 2001 ; Murchie et al., 2002 ; Walters et al., 2003 ; Bailey et al., 2004 ; Walters, 2005).

L'augmentation du transport électronique linéaire total le long de la chaîne de transport chloroplastique chez les plantes cultivées sous plus fort éclairage a été observée chez la moutarde (Wild et al., 1986), le pois (Leong et Anderson, 1984b ; Lee et Whitmarsh, 1989) ou l'épinard (Chow et Hope, 1987). Dans ces études, elle a été associée à la fois à une plus forte activité des PS II de ces plantes (avec un contenu supérieur en centres réactionnels PS II par unité de chlorophylle, basé sur des mesures de Q_B) et à un contenu en PS I supérieur (associé à des niveaux plus élevés en *cyt f*) comparativement à des plantes cultivées sous plus faible éclairage. Ces changements apparaissent dynamiques et sont observés à court terme après le transfert de plantes sous différentes conditions lumineuses (Davies et al., 1986 ; Chow et Anderson, 1987). L'augmentation du rapport chlorophylles a/b serait la conjonction d'une augmentation du contenu en centres réactionnels PS II (dont les chlorophylles sont principalement des chlorophylles a) et d'une diminution du contenu en antennes collectrices du PS II (LHCII, où les chlorophylles b sont situées principalement). De plus, nous observons une corrélation entre le rapport chlorophylles a/b et l'assimilation nette A_n max. Cette corrélation a été trouvée chez de nombreuses plantes et dénote un mécanisme de régulation commun pour ces deux paramètres (Bailey et al., 2001), dès lors communément utilisés comme indicateurs de l'acclimatation photosynthétique (Walters, 2003).

II.1.3 Acclimatation chez le mutant CMSII de Nicotiana sylvestris

Si la plupart de ces paramètres s'acclimatent de la même façon chez les plantes CMSII cultivées sous plus forte intensité lumineuse, le contenu qualitatif et quantitatif en chlorophylles semble affecté, puisqu'aucune différence n'est observée quant au contenu total en chlorophylles et au rapport chlorophylles a/b entre les plantes CMS 80 et CMS 350. L' A_n max et le rapport chlorophylles a/b sont donc également corrélés pour le CMSII, renforçant leur utilisation comme indicateur de l'acclimatation de l'appareil photosynthétique à l'intensité lumineuse. Toutefois, si les propriétés optiques des feuilles de CMS 350 apparaissent peu altérées en termes d'absorbance, de réflectance et de transmittance comparativement aux plantes WT 350, le rendement quantique de l'assimilation de CO₂ mesuré sous CO₂ et O₂ atmosphériques montre que 23 photons sont nécessaires à l'assimilation d'une molécule de CO₂ chez le CMS 350 alors que 15 seulement le sont pour les trois autres types de plantes étudiés : WT 80, CMS 80 et WT 350. La relation identique obtenue entre le rendement quantique du PS II et le rendement quantique de l'assimilation nette de CO₂ en absence d'oxygène comme accepteur d'électrons (à savoir que dans ces conditions, 9 photons sont

nécessaires à l'assimilation d'une molécule de CO₂ pour l'ensemble des plantes, CMS 350 compris), montre (1) que l'activité du PS II n'est pas affectée chez le CMS 350, mais également (2) l'existence d'un flux alternatif sur l'oxygène plus important chez les plantes CMS 350 par rapport aux WT 350. Le transport électronique linéaire total (ETR) est très largement en excès par rapport à A_n pour l'ensemble des plantes étudiées. Cet excès d'électrons est supérieur chez le CMS 350 par rapport au WT 350, excluant l'hypothèse des réactions primaires de la photosynthèse comme étape limitante pour l'acclimatation du mutant CMSII à une plus forte intensité lumineuse de croissance. Pour aller dans ce sens, le quenching photochimique, mesuré à l'aide des paramètres de fluorescence chlorophyllienne, est identique chez les plantes WT et CMSII cultivées sous une même intensité lumineuse.

La question du devenir des électrons non consommés par la photochimie (A_n et R_d) via l'existence de puits supplémentaires d'électrons chez le CMS 350 se pose à présent en parallèle de la recherche de(s) cause(s) du non ajustement de l'assimilation nette de CO₂ chez le CMSII à l'intensité lumineuse de croissance. L'implication des réactions secondaires de la photosynthèse a été explorée par le suivi des activités de deux enzymes majeures du métabolisme carboné : la Rubisco et la Saccharose Phosphate Synthase (SPS).

Si, en accord avec de précédentes études, les activités totales de la Rubisco et de la SPS s'acclimatent et augmentent lorsque les plantes, aussi bien WT que CMSII, sont cultivées sous plus fort éclairage (Rubisco : Anderson et Osmond, 1987 ; Bailey et al., 2001 et SPS : Savitch et al., 2000), les activités initiales (*in vivo*) de ces enzymes sont affectées et constitutivement plus faibles chez le CMS 350 que chez le WT 350, alors qu'elles sont identiques pour les plantes WT et CMSII cultivées sous très faible éclairage (WT 80 et CMS 80). Ainsi, les capacités de ces enzymes ne semblent pas constituer la cause primaire de la plus faible A_n observée chez le CMS 350 comparativement au WT 350 (ce qui est confirmé par les mesures de la capacité photosynthétique sous fort CO₂ par Dutilleul et al., 2003a). Cette différence est corrélée à de plus faibles activités *in vivo* des enzymes. Dès lors, quel(s) facteur(s) limiterai(en)t l'activité initiale Rubisco ?

II.1.4 Corrélation entre ETR, A_n et Act_i Rubisco ?

Plusieurs hypothèses sont envisageables afin de rendre compte de la plus faible activité initiale Rubisco observée chez le CMS 350 : (i) les propriétés intrinsèques de l'enzyme

(facteur de spécificité apparent S_{app}) ou (ii) la disponibilité en substrats pour l'enzyme (pouvoir réducteur et ATP provenant des réactions primaires ou de la respiration mitochondriale et CO_2).

Les facteurs de spécificité apparents, calculés sur la base des c_i et des c_c ($S_{app\ ci}$ et $S_{app\ cc}$) ne sont significativement pas différents entre les types de plantes étudiés et sont conformes aux valeurs obtenues dans la littérature chez le tabac (Jordan et Ögren, 1981 ; Kane et al., 1994). Les propriétés de l'enzyme ne sont donc pas affectées chez les plantes CMSII.

Comme décrit dans les paragraphes précédents, les réactions primaires, considérées en termes d'ETR, ne semblent pas limitantes pour l' A_n chez les plantes CMS 350. L'excès d'électrons est même supérieur chez ce mutant comparativement aux WT 350, ce qui rend peu probable l'hypothèse d'une limitation de l' A_n chez les CMS 350 par l'apport en ATP et NADPH. D'autres éléments vont dans ce sens. En effet, l' A_n ne serait pas affectée par l'apport d'ATP pour la synthèse de saccharose dans le cytosol, car sous CO_2 saturant, condition pour laquelle l'effet potentiellement limitant de l'ATP serait exacerbé, les A_n sont très proches entre les plantes WT 350 et CMS 350 (Dutilleul et al., 2003a). Du point de vue du NADPH, des mesures du contenu en NADPH cellulaire ont montré la présence d'une quantité plus importante chez le mutant CMSII cultivé sous $600 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ comparativement au WT cultivé dans les mêmes conditions (Dutilleul et al., 2005). D'autre part, l'export de NADPH des chloroplastes vers les mitochondries pour soutenir la respiration, impliquant principalement la valve malate et estimé par l'intermédiaire de l'activité de la NADP-MDH (Krömer, 1995 ; Padmasree et al., 2002 ; Scheibe, 2004) est très semblable entre les plantes CMS 350 et WT 350 après induction et stabilisation de la photosynthèse. Toutefois, l'activité initiale de la NADP-MDH est supérieure chez le CMSII par rapport au WT lors de l'induction de la photosynthèse (Dutilleul et al., 2003a) et les réponses des plantes WT 350 et CMS 350 à un transfert sous faible éclaircissement ou à une exposition de 3 h sous très fort éclaircissement diffèrent quelque peu. L'hypothèse d'une régulation par ce transfert de pouvoir réducteur entre les chloroplastes et les mitochondries ne peut donc être totalement exclue.

La disponibilité en CO_2 au niveau des sites catalytiques de la Rubisco, dans le stroma à l'intérieur des chloroplastes, met en jeu de nombreuses étapes potentiellement limitantes pour l'activité de l'enzyme, soit par une plus grande perte de CO_2 via la respiration mitochondriale à la lumière chez le CMS 350 comparativement au WT 350 (la respiration à l'obscurité étant

supérieure chez le CMS 350), soit par l'existence de plus fortes résistances au cours de la diffusion du CO₂ de l'atmosphère jusqu'à l'intérieur des chloroplastes chez ce CMS 350.

La respiration mitochondriale à la lumière mesurée au cours de cette étude est identique chez les plantes WT 350 et CMS 350, ce qui exclut son implication dans la plus faible assimilation nette obtenue.

Le trajet diffusionnel du CO₂ de l'atmosphère jusqu'à l'intérieur des chloroplastes comporte le passage de la couche limite, le passage des stomates (les deux étant compris dans ce que l'on nommera la **limitation stomatique**), ainsi que la diffusion dans les espaces intercellulaires, la dissolution en phase liquide, l'entrée dans les cellules et le trajet à l'intérieur de celles-ci pour atteindre les sites catalytiques de la Rubisco (ces étapes formant la **limitation interne**). Ces limitations stomatiques et internes ont été estimées, la première découlant des mesures des échanges gazeux foliaires et la seconde via l'utilisation combinée des isotopes stables du carbone et des échanges gazeux (voir partie Matériels et Méthodes).

En se basant sur les courbes $A_n=f(c_i)$, nous remarquons que pour une même concentration externe en CO₂, c_a , les plantes WT 350 et CMS 350 présentent un c_i identique ou très proche. D'autre part, la limitation stomatique, estimée selon Farquhar et Sharkey (1982) et Epron et Cornic (1995) ainsi que les indices stomatiques sont identiques chez ces plantes. Ces éléments tendent à exclure l'implication d'une limitation stomatique dans le non ajustement de l' A_n chez le CMS 350, allant dans le sens des hypothèses présentées par Dutilleul et al. (2003a).

La résistance interne à la diffusion du CO₂ est, pour un c_a incident de 400 ppm, deux fois plus élevée chez le CMS 350 que chez le WT 350. Ceci diminue la concentration en CO₂ intrachloroplastique (c_c) et, par conséquent, les réactions de carboxylation de la Rubisco (et ainsi A_n) au profit des réactions d'oxygénation. De précédentes études ont également montré l'existence d'une très forte corrélation entre A_n et g_m chez des plantes herbacées (von Caemmerer et Evans 1991, Evans et al., 1994) et des arbres (Lloyd et al., 1992 ; Loreto et al., 1992 ; Epron et al., 1995, Hanba et al., 1999 et 2002 ; De Lucia et al., 2003). De plus, Duranceau et al. (2001) avaient déjà mis en évidence une plus faible discrimination isotopique chez les CMSII, et avaient posé l'hypothèse de l'implication de la conductance interne pour l'expliquer (Duranceau et al., 2001).

Le rapport des vitesses de carboxylation et d'oxygénation de l'enzyme (V_c/V_o) ou des flux d'électrons dirigés vers l'une ou l'autre réaction (J_c/J_o), déterminés au cours de ce travail, sont supérieurs chez les plantes CMS 350 par rapport aux plantes WT 350. La valeur de J_c/J_o peut être utilisée comme une estimation relative (à un facteur multiplicatif près) de la concentration c_c en CO_2 dans les chloroplastes (Cornic et Massacci, 1996) car sa mesure, uniquement basée sur les mesures d'assimilation carbonée et de fluorescence chlorophyllienne, est indépendante de la conductance interne (ce qui n'est pas le cas pour le facteur de spécificité apparent $S_{cpp\ cc}$ et donc pour le rapport V_c/V_o : voir équations 22 à 26). Dès lors, l'obtention de résultats comparables en considérant soit le rapport V_c/V_o , soit le rapport J_c/J_o renforce l'idée de l'implication d'une plus faible conductance interne dans les différences observées, notamment par une augmentation de la photorespiration chez les CMS 350 comparativement au WT 350, mais également l'idée d'un facteur de spécificité apparent de la Rubisco identique entre les plantes étudiées.

Le rôle direct joué par la disponibilité en CO_2 pour la Rubisco et plus particulièrement par la limitation interne à la diffusion du CO_2 pour rendre compte des différences observées entre les plantes CMS 350 et WT 350, a été mis en avant au cours d'expériences de croissance des plantes sous fort CO_2 et d'exposition à une concentration en CO_2 calculée pour obtenir un même c_c pour ces deux types de plantes.

Cette limitation interne accrue chez les CMS 350 et la plus faible concentration intrachloroplastique en CO_2 qui en découle indiqueraient une photorespiration favorisée chez ce CMS 350 comparativement au WT 350. Les mesures d'activité Glycolate Oxydase, d'échanges gazeux et de fluorescence chlorophyllienne (montrant la minimisation des différences en conditions non photorespiratoires, et nous donnant accès aux rapports de vitesses des réactions carboxylase et oxygénase de la Rubisco et des flux électroniques dirigés vers ces deux réactions) vont également dans ce sens. La photorespiration constituerait un puits très important d'électrons pouvant rendre compte du lien à priori contradictoire existant entre l'excès d'électrons d'un côté et la plus faible assimilation nette de CO_2 de l'autre, chez le CMS 350 comparativement au WT 350. En effet, l'oxygène constitue un accepteur très important pour l'excès d'électrons intervenant au cours de la photosynthèse par deux processus majeurs : la photorespiration et la réaction de Mehler (Asada, 1999 ; Ort et Baker, 2002). Ces processus entrent alors en compétition avec l'assimilation nette de CO_2 .

La chlororespiration, via la plastidial terminal oxydase, peut également constituer un puits pour les électrons de la chaîne photosynthétique, bien qu'à priori son importance soit faible d'un point de vue quantitatif (Carol et Kuntz, 2001). Le contenu en protéines PTOX se révèle identique chez les plantes WT 350 et CMS 350 et très faible, notamment en comparaison avec une plante alpine *Ranunculus glacialis* (Streb et al., 2005). Cela tendrait à exclure tout rôle joué par cette voie dans les différences observées.

Suite à cette caractérisation de l'acclimatation de la photosynthèse à l'environnement lumineux chez *Nicotiana sylvestris* et des défauts observés chez le mutant CMSII, en termes de composition et de fonction de l'appareil photosynthétique, l'hypothèse de l'implication d'une signalisation rédox mise en avant ces dernières années a été envisagée (Escoubas et al., 1995 ; Pfannschmidt et al., 1999 et 2001a ; Walters, 1999 ; Oswald, 2001).

II.1.5 Acclimatation et signalisation rédox

Peu de choses sont connues quant aux mécanismes de régulation de l'acclimatation. Une hypothèse serait que le signal pour l'acclimatation proviendrait de changements de l'état rédox de composants du système de transport des électrons (tels que les quinones Q_A, premiers accepteurs des électrons du PS II, Huner et al., 1998), ou de déséquilibres dans le transport électronique photosynthétique (Walters et al., 1999). Ces deux éléments pourraient par la suite influencer l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme photosynthétique comme la transcription de gènes codant pour la grande sous-unité de la Rubisco ou pour les antennes collectrices du PS II (Pfannschmidt, 2003). Nous l'avons vu, le rapport chlorophylles a/b est identique chez les plantes WT 80 et CMS 80 mais inférieur chez le CMS 350 comparativement au WT 350, ce qui pourrait aller dans le sens de l'existence d'un signal chez le WT, absent chez le CMSII. L'hypothèse de l'implication d'une signalisation rédox dans notre système est renforcée par un état rédox cellulaire altéré chez le CMSII par rapport au WT, la mutation induisant notamment une augmentation de l'expression de certaines enzymes antioxydantes et de la quantité en NAD, NADH et NADPH (Dutilleul et al., 2003b et 2005).

Deux paramètres ont été utilisés au cours de cette étude afin d'estimer l'état rédox chloroplastique à deux niveaux : la chaîne de transport des électrons (état rédox des quinones Q_A) et le stroma (activité NADP-MDH). Le quenching photochimique, qP (donnant accès à

l'état rédox des Q_A selon 1-qP), est identique chez le CMS 350 et le WT 350 et répond très rapidement aux changements d'environnement lumineux lors des expériences de transfert de plantes 350 à 80 et inversement, rendant très peu probable l'implication de l'état rédox du pool de plastoquinones et de la chaîne de transport des électrons de façon plus générale, comme signal pour l'acclimation. Si les activités NADP-MDH constitutives initiales et totales sont très proches entre les plantes CMS 350 et WT 350, les différences de réponses observées entre ces plantes après des expositions de 3 h sous très fort éclairage ou lors des expériences de transfert ne nous permettent pas d'exclure des effets médiés par l'état rédox du stroma pour l'acclimation à l'intensité lumineuse. L'activité NADP-MDH est de plus différente entre les plantes WT et CMSII lors de l'induction de la photosynthèse après une transition obscurité-lumière (Duttilleul et al., 2003a), pouvant constituer un signal suffisant pour l'acclimation de la photosynthèse à l'intensité lumineuse de croissance.

Une dernière hypothèse a été émise quant à une signalisation impliquant les sucres, la synthèse des sucres étant très liée à l'assimilation carbonée (Rolland et al., 2002 ; Walters, 2005). Les mesures préliminaires de contenu cellulaire en glucose, fructose et saccharose réalisées par HPLC et des intermédiaires phosphatés (Glucose-6-phosphate, Fructose-6-phosphate) par Résonance Magnétique Nucléaire ne démontrent pas de différences significatives entre les plantes CMS 350 et WT 350 (*annexe 3*). L'implication d'un signal "sucres" ne peut toutefois pas être totalement exclue notamment aux vues des modifications de la balance carbone/azote foliaire mise en évidence par Duttilleul et al. (2005) chez les plantes CMSII de *Nicotiana sylvestris*.

II.II Conclusions

Qu'en est-il de l'implication de la mitochondrie et de son fonctionnement dans le processus d'acclimation d'une plante à l'intensité lumineuse de croissance ?

L'implication du métabolisme respiratoire mitochondrial dans le fonctionnement de la photosynthèse a été beaucoup étudiée et est aujourd'hui bien établie, bien que la signalisation qui y est associée soit encore mal connue. D'abord basée sur des études utilisant des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale notamment, le développement de mutants mitochondriaux viables a confirmé cette interdépendance. Parmi eux, les mutants NCS de

maïs présentent des délétions partielles ou totales de gènes mitochondriaux (Lauer et al., 1990; Newton et al., 1990; Gu et al., 1993; Marienfeld et al., 1994) et ne survivent que grâce à l'état hétéroplasmique de la mutation (Gu et al., 1993). A l'image des mutants CMSI et CMSII de *Nicotiana sylvestris*, ils présentent des anomalies de développement au niveau des organes végétatifs et reproducteurs. Les feuilles de ces mutants ont des stries vertes et jaunes. Alors que le défaut primaire se situe au niveau des mitochondries, ce phénotype au niveau foliaire démontre l'interdépendance des fonctions mitochondriales et chloroplastiques (Gu et al., 1993). Cette interconnection est mise en exergue chez le mutant CMSII de *Nicotiana sylvestris* pour lequel notre étude a montré qu'une altération de la fonction mitochondriale (non pas du point de vue quantitatif, les niveaux de respiration étant au moins aussi élevés chez les plantes WT que chez les plantes CMSII, mais plutôt de par les voies métaboliques impliquées) induit un défaut d'acclimatation de la photosynthèse à l'intensité lumineuse de croissance via une diminution de la conductance interne vis à vis du CO₂.

En quoi la mitochondrie peut-elle jouer un rôle au niveau de la conductance interne ?

La conductance interne (g_m) correspond à la diffusion du CO₂ dans les espaces intercellulaires sous forme gazeuse, puis à sa dissolution en phase liquide, et enfin à son entrée puis à sa diffusion à l'intérieur des cellules jusqu'aux sites catalytiques de la Rubisco, dans le stroma des chloroplastes. En se basant sur cette décomposition et sur quelques données de la littérature montrant que l'anatomie foliaire et la distribution des stomates ont des effets très importants sur g_m (Parkhurst and Mott 1990, Evans et al. 1994, Syvertsen et al. 1995, Kogami et al. 2001), plusieurs étapes peuvent être limitantes. Pour la diffusion dans les espaces intercellulaires, la réalisation de coupes transversales de plantes WT 80, WT 350, CMS 80 et CMS 350 a montré une plus grande épaisseur des feuilles de plantes (WT/CMSII) cultivées sous plus fort éclairage, mais n'a pas permis de démontrer des différences importantes entre les plantes WT 350 et CMS 350. Dans ce sens, nous n'avons pas mis en évidence de différence en termes de conductance stomatique et d'indice stomatique entre ces plantes.

Une autre hypothèse serait une limitation au niveau de l'entrée du CO₂ à l'intérieur des cellules. Un rôle des aquaporines dans la diffusion du CO₂ chez les plantes supérieures est de plus en plus envisagé. En effet, si les aquaporines sont des protéines caractérisées comme transporteurs d'eau au travers des membranes biologiques (pour revues, voir Kaldenhoff et Eckert, 1999 ; Tyerman et al., 1999 et 2002 ; Baiges et al., 2002 ; Kruse et al., 2006), et donc

présentant un rôle très important dans les réponses à la sécheresse, quelques études réalisées sur des cellules animales de mammifères ont indiqué que le CO₂ pouvait également être transporté via les aquaporines AQP1 (Cooper et Boron, 1998 ; Nakhoul et al., 1998). Plus récemment, Uehlein et al. ont obtenu une augmentation de la perméabilité membranaire au CO₂ chez les oocytes de Xénope exprimant l'aquaporine du tabac NtAQP1 (Uehlein et al., 2003). Ils n'ont toutefois pas mesuré g_m . Terashima et Ono (2002) ont constaté une diminution significative de g_m en présence de HgCl₂, inhibiteur de la plupart des aquaporines. Cependant, la non-spécificité du mercure et ses possibles effets secondaires ne permettent pas de conclure dans ce cas précis (Tyerman et al., 1999 ; Baiges et al., 2002). Le développement de plantes transgéniques exprimant ou surexprimant des aquaporines va dans le sens d'un rôle des aquaporines dans la diffusion du CO₂ et dans g_m en particulier (exemple du riz surexprimant l'aquaporine HvPIP2;1 de l'orge : Hanba et al., 2004).

Ainsi, compte tenu du rôle supposé des aquaporines dans la diffusion du CO₂, on pourrait formuler l'hypothèse de l'implication de ces dernières dans la plus faible disponibilité en CO₂ au niveau des chloroplastes des plantes CMS 350 via, par exemple une plus faible quantité d'aquaporines chez ce mutant. Ceci est corroboré par des expériences en cours menées au laboratoire 'Mitochondries et métabolisme' montrant un plus faible potentiel hydrique racinaire et une résistance accrue à la sécheresse chez le mutant CMSII comparativement au WT (Réda Djebbar, communication personnelle). Ainsi, un signal, dont nous ignorons la nature, impliquant la mitochondrie, pourrait réprimer un ou plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des aquaporines ou l'ouverture des aquaporines chez le mutant CMS 350, ce qui ne serait pas le cas lorsque les plantes sont cultivées sous 80 μmoles PAR m⁻² s⁻¹.

Enfin, une dernière possibilité serait que la diffusion du CO₂ à l'intérieur de ces cellules jusqu'aux chloroplastes soit altérée chez le mutant, à cause d'une efficacité moindre des anhydrases carboniques assurant l'interconversion entre les formes CO₂, CO₃²⁻ et HCO₃⁻, en fonction du pH du milieu. En effet, des liens étroits entre des sous-unités d'anhydrases carboniques et le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale chez *Arabidopsis* ont été mis en évidence (Sunderhaus et al., 2006).

II.III Articles

Cette partie du travail de thèse concernant l'acclimatation des plantes WT et CMSII de *Nicotiana sylvestris* a fait l'objet de deux articles scientifiques présentés en **articles 1 et 2**.

Réponses aux stress abiotiques

I. Résultats

I.I Contexte

L'existence (i) d'un excès d'électrons le long de la chaîne chloroplastique plus élevé (électrons non utilisés pour l'assimilation nette de CO₂, *figure 31*), (ii) d'une activation des voies alternes de respiration NADP(H) DH, ou encore (iii) d'une homéostasie rédox perturbée chez les plantes CMSII par rapport aux plantes WT, pourrait induire des systèmes antioxydants chez ces plantes. Cela nous amène à l'idée d'un stress constitutif chez les plantes CMSII. De récents travaux ont montré de plus une plus forte résistance de ce mutant vis à vis de l'ozone ou de la sécheresse, connus pour produire un stress oxydant (Dutilleul et al., 2003b, Réda Djebbar, comm. pers.). Deux questions se sont alors posées : l'impact de la mutation et celui de l'intensité lumineuse de croissance sur les réponses à deux types de stress abiotiques (un herbicide, le méthylviologène, noté MV, qui produit un stress oxydant, et un stress plus naturel, également de type oxydant, le froid associé à de très forts éclaircissements). Les résultats présentés ici portent sur l'analyse comparative des réponses à ces contraintes abiotiques de plants de tabacs sauvages et mutants CMSII cultivés sous deux conditions lumineuses incidentes (80 et 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

I.II Réponses aux forts éclaircissements associés ou non au MV

Le méthylviologène produit un stress oxydant à la lumière dans les chloroplastes, en acceptant les électrons provenant du PS I en amont du NADP⁺, et en les transférant directement à l'O₂ pour produire des ions superoxyde. Afin de caractériser un effet spécifique au MV, différents traitements dits « contrôles » sont effectués : l'application de fortes lumières sans MV, et deux traitements « obscurité », l'un sans MV, l'autre avec une forte concentration en MV. Différents paramètres sont étudiés afin de s'intéresser aux effets précoces et à plus long terme de ce stress, ainsi qu'aux différents compartiments cellulaires (chloroplastes : activité superoxyde dismutase: SOD, PS II, chlorophylle, transport électronique et A_n ; mitochondries : activité SOD ; péroxysomes : CAT ou cytosol: activités SOD, membranes cellulaires).

I.II.1 Fluorescence chlorophyllienne et activité Catalase

Le rapport F_v/F_m , indicateur du rendement quantique maximum du PS II, et l'activité Catalase sont deux paramètres facilement mesurables communément utilisés comme marqueurs précoces d'un stress oxydant (Streb et al., 1993).

A l'obscurité, aucun effet n'a été observé sur ces paramètres, en présence ou absence de MV. Cela démontre bien la nécessité de lumière pour une action rapide du MV (ses effets au niveau des chaînes de transport des électrons chloroplastiques voire mitochondriaux étant très retardés à l'obscurité).

I.II.1.a Rapport F_v/F_m

Sous l'effet d'une exposition sous 1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en absence de MV, nous observons une forte chute du rapport F_v/F_m la première heure puis une stabilisation autour de 0,6 pour l'ensemble des plantes étudiées (***figure 38A***). Le rendement quantique maximum du PS II diminue sous l'effet d'une exposition simultanée à forte lumière et en présence de MV. Cette diminution est accentuée par rapport à une exposition aux fortes lumières seules pour l'ensemble des plantes (***figure 38***). Toutefois, la cinétique se révèle dépendante de la concentration en MV et du temps d'exposition appliqués (***figure 38A, 38B, 38C, 38D***) :

- Tout d'abord, le rapport F_v/F_m atteint la première heure des valeurs comparables à celles obtenues sous forte lumière en absence de MV chez tous les types de plantes (environ 0,65-0,7), ce qui peut indiquer que le MV n'est pas arrivé à son site d'action, au niveau du PS I.
- Quelle que soit la concentration en MV, les mutants CMS 80 et CMS 350 maintiennent une évolution au plus proche de celle caractérisée en l'absence de MV sous forte lumière après 2 et 3 h. Il en va de même pour les WT 350, mais uniquement à la concentration la plus faible, de 5 μM . Aux plus fortes concentrations, et pour le WT 80 dès la concentration de 5 μM , la cinétique de diminution du rapport F_v/F_m observée la première heure se maintient avec une durée dépendante du temps d'exposition et de la dose de MV appliquée : plus la concentration en MV est forte, plus l'effet du traitement est important et rapide.
- L'effet additif du MV par rapport aux fortes lumières seules sur la diminution du rapport F_v/F_m apparaît 'retardé' (c'est-à-dire qu'il nécessite une dose plus importante et/ou un temps d'exposition plus long) chez les plantes CMSII par rapport aux plantes WT. Il en va de même lorsque l'on compare le WT 350 par rapport au WT 80 et le CMS 350 par rapport au CMS 80, les plantes cultivées sous plus fort éclairage ayant une diminution du rapport F_v/F_m retardée. En effet, un

rapport F_v/F_m nul est obtenu après 9 h dans 5 μM mM de MV chez le WT 80, après 9 h dans 50 μM chez WT 350, après 9 h dans 1 mM chez CMS 350 et n'a pas été observé chez CMS 80 dans nos conditions expérimentales.

1.1.1.b Activité Catalase

Les résultats présentés ici ont été obtenus après 9 h sous 1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sous une concentration donnée en MV (0, 5 μM , 50 μM et 1 mM : ***figure 38E***). Après 9 h de ce traitement en absence de MV, l'activité CAT n'est affectée significativement que pour les plantes WT 80 (***figure 38E***). Les effets du MV associés à la forte lumière sont dose-dépendants. Nous constatons que plus la concentration en MV est forte, plus l'activité est réduite. Dans ce cas encore, le WT 80 présente les diminutions les plus fortes. Pour une concentration de 5 μM en MV, seul le WT 80 a son activité CAT réduite de l'ordre du quart, alors que l'activité de l'enzyme n'est pas ou peu affectée pour les autres types de plantes. Après 9 h de traitement à une concentration de 1 mM en MV, l'activité CAT des plantes WT 80 est très faible (elle atteint 30% de la valeur initiale) et apparaît deux à trois fois plus faible que pour les autres plantes pour lesquelles l'inhibition de l'activité enzymatique est d'un peu moins de 50%.

1.1.2 Contenu en chlorophylles

Le contenu total en chlorophylles et le rapport chlorophylles a/b ont été déterminés après 1 à 9 h de traitement sous 1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et différentes concentrations en MV (0, 5 μM , 50 μM et 1 mM : ***figure 38F***). En absence de MV, seule une légère diminution de la quantité totale en chlorophylles est observée après 9 h, le rapport chlorophylles a/b n'étant pas affecté.

Pour les quatre types de plantes étudiés la combinaison d'une forte lumière et du MV entraîne une diminution de la quantité de chlorophylles de manière dose de MV dépendante. Cependant, pour une concentration donnée, cette diminution est moins importante chez les plantes CMSII, en particulier en comparant les plantes cultivées sous faible éclaircissement incident. Il n'apparaît pas de différence significative entre les réponses des plantes WT 350, CMS 80 et CMS 350.

Ces résultats sont renforcés par l'observation directe de la perte de la coloration verte des disques foliaires après 24 h de traitement associant 1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et différentes concentrations en MV, de 0 à 50 μM (**figure 39**). En effet, la chlorophylle est totalement dégradée pour une concentration en MV de 2,5 à 5 μM pour les plantes WT 80, 10 μM pour les plantes WT 350 et 50 μM pour les plantes CMSII.

Ceci confirme donc, d'une part, la plus grande sensibilité des plantes WT par rapport aux plantes CMSII et cela quelles que soient leurs conditions de croissance respectives et, d'autre part, l'effet bénéfique d'une intensité lumineuse de croissance élevée sur la résistance vis-à-vis du traitement appliqué chez les plantes WT, cet effet n'étant pas ou peu visible pour les plantes CMSII.

1.II.3 Conductivité et peroxydation lipidique

Deux méthodes ont été utilisées afin d'évaluer les éventuels dégâts causés au niveau membranaire : la détermination du contenu en malondialdéhyde, MDA, produit de dégradation des lipides membranaires, et la mesure de la conductivité (**figure 40**).

Un traitement 'témoin' n'a montré aucun effet de la lumière forte (1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$) appliquée seule sur l'intégrité des membranes cellulaires de l'ensemble des plantes étudiées, les valeurs de conductivités obtenues après 24 h de traitement étant très semblables aux valeurs constitutives, autour de 10%. La combinaison d'une concentration de 5 μM de MV à ce traitement lumineux induit une augmentation significative de la conductivité pour l'ensemble des plantes, l'importance et la cinétique de cette augmentation variant toutefois en fonction du génotype et des conditions lumineuses de croissance (**figure 40A**). En effet, bien qu'aucun effet n'ait été mesuré après trois heures de traitement, les membranes sont presque totalement détruites dès 6 h de traitement pour les plantes WT 80, qui se révèlent à nouveau comme le type de plante le plus sensible. A 6 h, l'estimation de la destruction des membranes cellulaires atteint 90% pour ces plantes. Elle est de 55% pour les plantes CMS 350, de 30% pour les plantes WT 350 et un effet significatif n'est observé chez les plantes CMS 80 qu'après 9 h de traitement (**figure 40A**). Après 24 h, les membranes des plantes WT 80, WT 350 et CMS 350 sont complètement détruites alors que la conductivité n'atteint que 50% pour les plantes CMS 80 (**figure 40A**).

Ces résultats concordent avec les mesures du contenu en malondialdéhyde des feuilles, caractérisant les plantes WT 80 comme les plus sensibles. Toutefois, le mutant CMS 80 a un

comportement intermédiaire entre celui des plantes WT 80 et celui des plantes WT 350 et CMS 350 du point de vue de l'évolution de son contenu en malondialdéhyde (**figure 40B**).

Pour résumer, les dégâts causés au niveau des membranes cellulaires apparaissent le plus précocement chez le WT 80, puis chez les plantes WT 350 et CMS 350, et les dommages semblent les plus retardés chez le CMS 80. De la même façon, le rapport F_v/F_m est le moins affecté chez le CMS 80 alors que les activités Catalase et le contenu en chlorophylles sont les moins affectés chez le CMS 350 (**figure 38**). Dans tous les cas, les plantes CMSII apparaissent plus résistantes au stress MV appliqué par rapport aux plantes WT cultivées dans les mêmes conditions. Deux hypothèses peuvent rendre compte de ce résultat : (i) une diffusion plus faible de l'herbicide à l'intérieur des feuilles de CMSII et/ou (ii) un système antioxydant plus activé chez ces plantes CMSII par rapport aux plantes WT.

1.II.4 Diffusion du MV à l'intérieur des feuilles et effets du MV sur l'assimilation nette de CO₂ et le transport électronique linéaire chloroplastique

1.II.4.a Diffusion du MV à l'intérieur des feuilles

Au cours de nos traitements, les solutions de MV ne sont pas infiltrées dans les tissus foliaires, les disques foliaires ou les feuilles entières étant incubés dans des boîtes de Pétri. Pour savoir si les différences observées sont liées uniquement à des phénomènes de diffusion du MV de la solution jusqu'à l'intérieur des feuilles (liés aux différences de structure) où il produit son effet, nous avons tiré profit du dispositif d'étude des échanges gazeux foliaires Licor. Celui-ci assure un suivi de la transpiration foliaire qui permet une estimation de la quantité de MV entrant dans la feuille, comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes.

La **figure 41A** décrivant l'accumulation du MV au cours du temps, montre une diffusion retardée du MV à l'intérieur des feuilles de plantes CMSII par rapport aux plantes WT cultivées dans les mêmes conditions. Cette différence est beaucoup plus marquée pour les plantes cultivées sous 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En effet, après deux heures d'incubation d'une feuille entière dans une solution de MV 1 mM, nous avons pu estimer une concentration à l'intérieur des feuilles de WT 80 de 2,16 nM, de 1,85 nM pour les feuilles de CMS 80, de 3,12 nM pour les feuilles de WT 350 et de 1,5 nM pour les feuilles de CMS 350 (**figure 41A**). Cette différence de diffusion du MV pourrait donc expliquer, au moins en partie, la plus forte sensibilité des plantes WT aux traitements MV réalisés, ou en d'autres termes, les effets retardés observés chez les plantes CMSII, et CMS 80 en particulier.

1.II.4.b Effets du MV sur l'assimilation nette de CO₂ et le transport électronique chloroplastique

Les résultats présentés ***figure 41B*** montrent que les effets observés sur l'assimilation nette de CO₂, A_n , et sur le transport électronique le sont pour de plus faibles concentrations en MV à l'intérieur de la feuille chez les plantes WT 80 (une inhibition de 50% de A_n est mesurée pour une concentration en MV dans les feuilles d'environ 2,5 nM pour les plantes WT 80, d'environ 6 nM pour les plantes CMS 80, d'environ 6,5 nM pour les plantes WT 350 et 8 nM pour les plantes CMS 350 : ***figure 41B***). En outre, conformément à ce que l'on pourrait attendre compte tenu du mode d'action du MV, la diminution de l' A_n est plus précoce et nécessite de plus faibles concentrations en MV que celle du transport électronique linéaire total (ETR), qui augmente même dans un tout premier temps, le MV jouant le rôle d'accepteur des électrons en aval du PS I (dans ce sens, une inhibition de 50% de l'ETR est mesurée pour une concentration en MV dans les feuilles d'environ 3 nM pour les plantes WT 80, 7,5 nM pour les plantes CMS 80, 8 nM pour les plantes WT 350 et 10 nM pour les plantes CMS 350 : ***figure 41B***). Ainsi, la concentration en MV à l'intérieur des tissus foliaires nécessaire à l'inhibition de l' A_n et de l'ETR à hauteur de 50% chez les plantes CMS 80 est double comparativement à celle des plantes WT 80 et quasi équivalente à celle des plantes WT 350.

Les plantes CMSII tolèrent donc de plus fortes concentrations en MV que les plantes WT cultivées dans les mêmes conditions, de même que les plantes cultivées sous plus fort éclairage par rapport aux plantes cultivées sous 80 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Par conséquent, les différences de diffusion de l'herbicide à l'intérieur des feuilles WT et CMSII n'expliquent pas à elles seules les différents niveaux de résistance observés d'un génotype à l'autre ou d'une condition de croissance à l'autre. D'autres hypothèses sont envisagées, d'une part avec l'étude de l'inactivation maximale du rendement quantique du PS II et de la catalase en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique (pour une estimation des capacités de remplacement des protéines inactivées par synthèse *de novo*, l'hypothèse étant qu'une plante moins sensible au stress présente une inactivation plus lente associée à une capacité de synthèse protéique supérieure), et d'autre part avec l'étude du système antioxydant de ces plantes.

1.II.5 Réponses au MV en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique

Les effets d'une concentration en MV de 5 μM sur les deux indicateurs précoces de stress (inhibition du rapport F_v/F_m et de l'activité CAT) ont aussi été étudiés en présence, soit de

lincomycine (inhibiteur de la synthèse des protéines codées par les génomes des organites, dont le chloroplaste, ce qui concerne ainsi la protéine D1 des centres réactionnels des PS II), soit de cycloheximide (inhibiteur de la synthèse des protéines codées par le génome nucléaire, ce qui est le cas de la catalase). Les résultats sont présentés *figure 42*.

Deux concentrations de lincomycine ont été testées : 3 mM et 6 mM, donnant des résultats très comparables. Ainsi, nous ne considérerons par la suite que la concentration de 3 mM. Des expériences contrôles ont été réalisées à l'obscurité. Elles ont montré l'absence d'effet de la lincomycine (en présence ou absence de MV) sur le rapport F_v/F_m . Sous une intensité lumineuse incidente de $1000 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en présence simultanée de lincomycine et de MV, l'inhibition du rapport F_v/F_m est accélérée comparativement aux résultats obtenus en présence de MV seul. En effet, une inhibition de 50% du rapport F_v/F_m est obtenue après 2h30 pour l'ensemble des plantes en présence de l'inhibiteur, alors qu'en présence de MV seul, 3 h sont nécessaires pour le WT 80, 4 h pour le WT 350, 5 h pour le CMS 80 et un peu plus de 6 h pour le CMS 350 (*figures 38B et 42A*). L'importance des mécanismes de réparation par synthèse *de novo* de protéines chloroplastiques (et notamment de la protéine D1) pour lutter contre la chute du rapport F_v/F_m est ainsi soulignée. Les différences observées en présence de MV seul sont ici très atténuées, ce qui peut suggérer une capacité de synthèse de nouvelles protéines supérieure chez les plantes CMSII, ces plantes CMSII présentant une cinétique d'inhibition du rapport F_v/F_m toujours plus lente et retardée (*figures 38B et 42A*).

En présence de cycloheximide (deux concentrations ont été testées : $35,5 \mu\text{M}$ et $71 \mu\text{M}$, donnant des résultats identiques) et d'une luminosité incidente de $1000 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$, les effets sur la dégradation des chlorophylles et l'activité CAT ont été étudiés après 24 h de traitement (*figure 42B*). Peu de différences sont à noter, l'activité CAT étant quasiment totalement inhibée après 24 h de traitement pour l'ensemble des plantes étudiées (non montré).

I.II.6 Eléments du système antioxydant

I.II.6.a Activités SOD

Les résultats des activités SOD, détoxifiant les ions superoxydes produits notamment de la réaction impliquant le MV, sont présentés *figure 43A*. Sur la base du métal co-facteur, trois

classes de SOD ont été identifiées chez les plantes. Les FeSODs sont localisées dans les chloroplastes, les MnSODs dans les mitochondries et les Cu/ZnSODs sont trouvées dans les chloroplastes, le cytosol et les peroxysomes (Bowler et al., 1994). La bande de haut poids moléculaire sur gel correspond à l'activité MnSOD mitochondriale et la bande de plus faible poids moléculaire correspond à l'activité FeSOD chloroplastique. L'identité des isoformes a été confirmée par une approche pharmacologique : H₂O₂ inhibe les FeSOD et Cu/ZnSOD alors que le KCN inhibe uniquement la Cu/ZnSOD (voir Matériels et Méthodes et *annexe 2*).

Au niveau constitutif (après une heure de photopériode), les activités SOD cytosoliques et chloroplastiques sont supérieures chez les plantes CMS 350 par rapport aux plantes WT 350. C'est l'inverse pour l'activité SOD mitochondriale. En présence de MV et de 1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nous observons pour ces deux types de plantes une légère induction de l'activité SOD mitochondriale, une diminution progressive de l'activité chloroplastique et une légère augmentation de l'activité cytosolique (*figure 43A*). Après 9 h de traitement, l'activité SOD chloroplastique est quasi nulle chez le CMS 350 alors qu'elle perdure chez les plantes WT 350. L'activité SOD cytosolique est très supérieure et l'activité SOD mitochondriale légèrement supérieure chez les plantes CMS 350 par rapport aux plantes WT 350 (*figure 43A*). Les plantes CMS 80 présentent des activités SOD constitutives et des cinétiques proches de celles des plantes CMS 350 tandis que les plantes WT 80 ont les activités les plus faibles parmi les plantes étudiées, ces activités devenant rapidement (dès 6 h) difficilement détectables (non montré).

Ainsi, l'activité SOD chloroplastique, légèrement inférieure chez les plantes CMS 350 par rapport aux plantes WT 350 au cours du traitement, ne semble pas impliquée dans la protection du PS II, ce dernier étant moins affecté chez les CMS 350 (voir rapport F_v/F_m , *figure 38*). L'activité SOD cytosolique, quant à elle, semble jouer un rôle essentiel. Son activité suit les niveaux de résistance du PS II et le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires au cours du stress.

1.11.6.b Contenu en caroténoïdes

Les résultats sont présentés *figure 43B*. Les plantes CMSII présentent des contenus en caroténoïdes constitutivement supérieurs à ceux des plantes WT cultivées dans les mêmes conditions, cette différence étant toutefois significative uniquement pour les plantes cultivées

sous faible éclairement ($p < 0,05$). La croissance sous $350 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ au lieu de $80 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ induit une augmentation significative du contenu en caroténoïdes chez les plantes WT et CMSII. Après 9h d'un traitement associant $5 \mu\text{M}$ à une luminosité incidente de $1000 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$, le contenu en caroténoïdes diminue pour l'ensemble des plantes, toutefois de façon nettement plus marquée chez les plantes WT 80.

Comme la plus faible diffusion du MV et l'étude de certains éléments du système antioxydant n'ont pas permis d'expliquer à elles seules la plus forte résistance des paramètres chloroplastiques (PS II: F_v/F_m , chlorophylles) chez le CMS 80 vis-à-vis du stress, nous avons envisagé l'implication du transport électronique cyclique autour du PS I.

1.II.7 Transport cyclique autour du photosystème I

Il s'agit ici de résultats préliminaires, mais, si le transport cyclique semble du même ordre de grandeur pour les plantes WT 80, WT 350, CMS 350, il apparaît supérieur chez le CMS 80 à 25°C si l'on considère, entre les mesures 1 et 2, d'une part le pourcentage de la phase rapide de la réduction du PS I qui augmente et, d'autre part, la relative stabilité de la valeur de la constante T_{0b} chez ce mutant CMS 80 (**figure 44**). La valeur de cette constante T_{0b} , de 1,9 à la lumière chez le CMS 80, apparaît inférieure à celle de plantes WT 80. Cela peut également suggérer un transport cyclique autour du PS I supérieur.

I.III Réponses au froid associé à de forts éclairements

L'intérêt est ici de comparer les effets d'un stress naturel associant le froid à de fortes intensités lumineuses (souvent considéré comme un stress oxydant et présentant d'autres effets tels que le ralentissement des réactions métaboliques) aux effets observés jusqu'alors avec le MV.

Les courbes de réponses du rapport F_v/F_m en fonction de la durée d'exposition ont été réalisées pour le traitement associant une exposition au froid (environ 5°C) à de fortes intensités lumineuses incidentes ($1000 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Différents traitements contrôles ont été réalisés : un traitement au froid à une intensité lumineuse plus modérée ($100 \mu\text{moles}$

PAR $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et un autre à l'obscurité. L'exposition à une température ambiante (20°C) a été décrite précédemment dans ce chapitre. Les résultats sont présentés **figure 45**.

Pour l'ensemble des plantes étudiées et après 9 h de traitement, le rapport F_v/F_m n'est pas affecté à l'obscurité et diminue de l'ordre de 25% lorsque le froid est associé à une intensité lumineuse incidente de $100 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Sous forte lumière associée au froid, les plantes cultivées sous une intensité lumineuse incidente de $80 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ont un F_v/F_m qui diminue plus fortement que celui des plantes cultivées sous $350 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cette différence de réponse liée à l'intensité lumineuse de croissance des plantes apparaît plus marquée après 4 à 6 h de traitement (**figure 45**). Le rapport F_v/F_m diminue plus fortement pour WT 80 que pour le CMS 80, alors que c'est pour le CMS 350 que ce rapport diminue le plus fortement par rapport au WT 350 (**figure 45**).

L'effet de la lincomycine, inhibiteur de la synthèse protéique chloroplastique a également été étudié dans ces conditions (**figure 45**) et comparé avec le traitement réalisé précédemment à température ambiante (**figure 41**). Le froid accentue l'inhibition du rapport F_v/F_m en présence de lincomycine, la différence observée entre les courbes obtenues au froid et à température ambiante nous renseignant sur la capacité des plantes à synthétiser de nouvelles protéines au froid. Une synthèse de nouvelles protéines chloroplastiques apparaît donc possible au froid pour les plantes WT, contrairement aux plantes CMSII pour lesquelles cette synthèse *de novo* est inexistante ou très faible. Cette capacité de réparation suite à une contrainte associant le froid et l'excès de lumière a été étudiée pour le PS II en conditions favorables, à température ambiante, sous quatre conditions de luminosité : obscurité, 10, 80 et $350 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I.IV Récupération

Les expériences mentionnées dans les paragraphes précédents nous permettent de définir un temps d'application d'un traitement froid associé à $1000 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ d'éclairement incident, qui nous permettra d'atteindre les niveaux d'inhibition du rendement quantique maximum du PS II voulus (25, 50 et 75% : par exemple, pour obtenir une inhibition de 50%, nous appliquerons le traitement 4 h pour le WT 80 et 5 à 6 h pour les trois autres plantes). Les résultats obtenus montrent que les quatre types de plantes retrouvent un F_v/F_m initial après une inhibition de 25% du rapport F_v/F_m . Toutefois, ce retour à la valeur initiale est très rapide (1 à 2 heures) chez le WT 350, l'est un peu moins chez les deux CMS (80 et 350) et est le plus lent

chez le WT 80 (environ 10 h). Néanmoins, cette récupération n'a lieu que sous très faible lumière et ne se produit pas quand les plantes sont placées à l'obscurité.

Toute inhibition égale ou supérieure à 75% du rapport F_v/F_m apparaît comme irréversible pour les quatre types de plantes étudiés dans l'intervalle de temps que nous nous sommes fixés.

Après inhibition du rapport F_v/F_m de l'ordre de 50%, nous remarquons que les plantes (WT et CMSII) récupèrent le mieux à la condition qui correspond à leur intensité lumineuse de croissance (**figure 46**). De plus, la croissance sous plus forte intensité lumineuse induit une récupération plus rapide des plantes CMS 350 et WT 350 comparativement aux plantes CMS 80 et WT 80 respectivement (**figure 46**). Les plantes CMS 350 récupèrent au moins aussi bien que les plantes WT 350 pour l'ensemble des conditions étudiées, ce qui suggère que ce mutant n'est pas limité par l'activité mitochondriale médiée par l'ATP, nécessaire à la synthèse de nouvelles protéines D1 du PS II. Le mutant CMS 80 présente un comportement particulier en étant le type de plante récupérant le moins pour l'ensemble des conditions étudiées (**figure 46**).

Réponses aux stress abiotiques

II. Discussion - Conclusions

Le but de cette étude est de mieux comprendre les mécanismes de lutte vis-à-vis d'un stress oxydant (induit par le méthylviologène) ou d'un stress plus naturel (froid associé à de forts éclairagements) chez un mutant de tabac (*Nicotiana sylvestris*), affecté au niveau du premier complexe protéique de la chaîne respiratoire mitochondriale en comparaison avec le type sauvage. Pour cela, nous avons étudié plusieurs paramètres liés à ce type de stress, (i) les cibles : inactivation de la protéine D1 du PS II et de la catalase, dégradation de la chlorophylle et des membranes cellulaires et (ii) les moyens de protection : caroténoïdes, activités enzymatiques antioxydantes (SOD), capacité de réparation et flux cyclique autour du PS I).

II.1 Le CMSII est plus résistant au MV

II.1.1 La lumière seule n'a pas ou peu d'effet

Dans un premier temps, nos mesures réalisées sous 1000 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ne montrent qu'une légère photoinhibition du PS II (diminution de l'ordre de 25-30% du rapport F_v/F_m) chez les quatre type de plantes et une inactivation significative de la catalase uniquement chez le WT 80, qui sont des symptômes précoces de ce type de stress (Streb et al., 1993).

II.1.2 Réponses au stress oxydant

Globalement, qu'elles soient sauvages ou mutantes, les plantes se révèlent sensibles au MV associé à un fort éclairagement (inhibition du rapport F_v/F_m et inactivation de la catalase). Ceci est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature (Aro et al., 1993). En effet, la dégradation de la protéine D1 située dans le centre réactionnel du PS II est l'une des principales conséquences de l'exposition à de fortes intensités lumineuses (Shang et Feirabend, 1998). L'enzyme catalase est également inactivée à la lumière (Feierabend et al., 1992). Toutefois, deux facteurs influencent le degré de sensibilité de la plante. Il s'agit de l'intensité lumineuse de croissance (les plantes cultivées sous 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sont en effet moins affectées que celles cultivées sous 80 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et de la présence d'un complexe I respiratoire fonctionnel (les plantes WT et CMSII réagissant différemment).

La diminution du rapport F_v/F_m sous l'effet de la contrainte est retardée chez les CMS 80 par rapport aux WT 80. Cette différence est moins marquée entre les plantes WT et CMS

cultivées sous 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ceci indiquerait une influence de la mutation sur la réponse à court terme à ce traitement, ce qui pourrait être dû à la présence de moyens de protection constitutivement plus développés chez les plantes mutantes (Dutilleul et al., 2003b). Dans cette étude, un contenu en caroténoïdes et une activité catalase supérieurs chez CMS 80 par rapport au WT 80 le suggèrent également. En effet, Havaux et Niyogi (1989) ont montré que les caroténoïdes, en plus de leur fonction de pigment collecteur de lumière pour la photosynthèse, sont capables de désactiver certaines molécules réactives : l'oxygène singulet et la chlorophylle triplet. Sous forte lumière, un caroténoïde, la violaxanthine est rapidement dé-époxydé en zéaxanthine (fonctionnement du cycle des xanthophylles) ce qui favoriserait des changements de conformation des complexes collecteurs de lumière (LHC) conduisant à une augmentation de leur capacité à dissiper l'énergie lumineuse absorbée sous forme de chaleur (quenching non photochimique).

Les mesures du contenu en caroténoïdes et des activités SOD et CAT montrent donc qu'au moins une partie du système antioxydant est plus actif chez les plantes CMSII comparativement aux plantes WT. Ceci est beaucoup plus marqué lorsque ces plantes sont cultivées sous faible éclaircissement. De nombreuses études ont montré que l'activation de systèmes antioxydants confère à la plante considérée une résistance accrue au stress. Par exemple, Perl et al. (1993) ont montré une résistance accrue au méthylviologène de plantes de tomates transgéniques surexprimant la Cu/Zn SOD cytosolique et chloroplastique. Aono et al. (1991) ont montré une résistance accrue à ce type de stress d'un tabac transformé exprimant une GR bactérienne dans leur cytosol par rapport aux tabacs non transformés. De la même façon, des plantes transgéniques présentant des niveaux constitutifs supérieurs en GR chloroplastique et SOD chloroplastique et cytosolique, ont une résistance accrue vis à vis d'un stress oxydant (Sen Gupta et al., 1993; Aono et al., 1993; van Camp et al., 1994; Pitcher et Zilinskas, 1996). De plus, en réponse à un traitement méthylviologène, il a été observé un ralentissement de la chlorose, de la chute de la fixation de CO_2 , des activités antioxydantes (CAT et SOD) et du rapport F_v/F_m chez des plantes de tabacs transgéniques exprimant une catalase d'*Escherichia coli* (Miyagawa et al., 2000).

L'importance de l'intensité lumineuse de croissance dans la réponse au stress a été illustrée en 1987, par Gillham et Dodge qui ont montré que des pois cultivés sous plus fort éclaircissement présentent de plus fortes activités enzymatiques antioxydantes et qu'ils étaient plus tolérants vis-à-vis du méthylviologène. Chez le pois, les activités SOD, APX et GR, ainsi que les

niveaux de transcrits SOD et GR chloroplastiques sont corrélés avec la résistance au traitement méthylviologène des feuilles jeunes, ce qui est mis en parallèle avec une plus forte activité photosynthétique de ces feuilles comparativement aux feuilles plus âgées (Donahue et al., 1997). Dans notre étude, la croissance sous une plus forte intensité lumineuse (350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ au lieu de 80) induit chez les plantes WT une très forte augmentation de l'assimilation nette de CO_2 ainsi qu'une plus grande résistance vis-à-vis du MV. En revanche, chez les plantes CMSII, la croissance sous une intensité lumineuse plus élevée n'induit qu'une faible augmentation de l'assimilation nette et le niveau de résistance observé entre ces deux types de plantes dans le cadre des paramètres étudiés est assez similaire : une corrélation entre le niveau de résistance et l'intensité lumineuse de croissance n'est donc pas observée ici. Les plantes CMS 80 présentent constitutivement certains éléments du système antioxydant activés par rapport aux plantes WT 80, et proches de celui des plantes CMS 350 : le niveau de résistance apparaît donc directement corrélé avec l'activation du système antioxydant et à la diffusion du MV à l'intérieur des feuilles, qui diffère d'une plante à une autre.

En considérant l'ensemble de ces éléments, un scénario possible pour expliquer la résistance accrue des plantes CMSII comparativement aux plantes WT peut être établi. L'herbicide qu'est le méthylviologène agit dans les chloroplastes à la lumière en générant des ions superoxyde au niveau de la chaîne linéaire de transfert des électrons, en aval du PS I (pour revue Dodge, 1994). Le méthylviologène constitue dès lors un puits d'électrons supplémentaire en compétition avec le NADPH, ce qui a pour conséquence une augmentation transitoire du transport électronique linéaire le long de la chaîne chloroplastique (ETR) et une diminution de l'assimilation carbonée. Aux stades précoces du stress, les ions superoxyde générés par le MV sont dismutés en H_2O_2 par la SOD (Asada et Kiso, 1973), l' H_2O_2 étant alors piégé par les systèmes de défense de la plante (dont le cycle ascorbate-glutathion : Foyer et Mullineaux, 1994). Chez les plantes CMSII, les activités SOD et APX élevées peuvent permettre une détoxification plus efficace des FAO produites au cours de ce stress.

Des travaux récents se sont intéressés à l'étude comparative des réponses au stress MV de mitochondries animales et végétales (Peixoto et al., 2004) et ont montré une plus grande résistance des mitochondries végétales (provenant des tubercules de pomme de terre) comparativement aux mitochondries animales (de foie de rat). Cette différence de sensibilité pourrait impliquer l'Alternative Oxydase, spécifique des plantes et de certains champignons, dont il a été envisagé un rôle pour minimiser la formation de FAO le long de la chaîne

mitochondriale de transfert des électrons (Purvis, 1997 ; Maxwell et al., 1999). En effet, l'expression de la protéine AOX est très souvent induite dans les mitochondries de plantes exposées à un stress (Minagawa et al., 1992 ; Rhoads, 1993 ; Simons et al., 1999), et notamment le méthylviologène (Taylor et al., 2002). De plus, un plus fort engagement de l'enzyme a été observé en réponse à différents types de stress abiotiques, dont la réponse à la sécheresse (Ribas-Carbo et al., 2005) ou à un herbicide (Gaston et al., 2003). Le mutant CMSII présente constitutivement une quantité de transcrits, une activité et une capacité AOX supérieures à celles du WT (Sabar et al., 2000). De plus, la respiration à l'obscurité est toujours supérieure chez le CMSII par rapport au WT, les électrons supplémentaires se répartissant aussi bien dans la voie respiratoire de la cytochrome, COX que dans la voie alternative AOX chez les plantes CMSII par rapport aux WT (Vidal et al., 2006). Une voie AOX plus active pourrait entre autres favoriser une dissipation d'énergie sous forme de chaleur et donc minimiser la production de FAO. Une voie COX plus active pourrait quant à elle compenser la perte du complexe I en termes de translocateur de protons pour la synthèse d'ATP mais également participer à une plus forte synthèse d'ascorbate chez le CMSII. C'est pourquoi il serait intéressant d'estimer l'engagement et la répartition des électrons le long de ces deux voies de respiration pour des plantes placées à la lumière et soumises à l'action combinée du méthylviologène et de fortes intensités lumineuses. Dans ce contexte, nous avons débuté une collaboration visant à caractériser nos plantes du point de vue de l'engagement des électrons dans les voies respiratoires AOX et COX en fonction d'une part de l'âge des feuilles et d'autre part du stade de développement des plantes. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Physiologia plantarum* (voir **article 3**).

II.II Froid associé aux forts éclaircements = stress oxydant ?

Les effets du froid sur la photosynthèse sont connus: il inhibe la plupart des réactions métaboliques enzymatiques, ralentissant voire inhibant notamment les réactions d'assimilation du carbone. Brüggemann (1992) a démontré de plus que les basses températures inhibent la photosynthèse en limitant la consommation des équivalents réduits (tels que NAD(P)H), et que cela augmentait la sensibilité à la photoinhibition sous un excès de lumière, conformément à nos résultats (photoinhibition accrue sous forte lumière à basse température : **figure 46**).

De nombreuses études présentent des résultats comparables (Wise, 1995; Huner et al., 1998). La plante réagit en modifiant le rapport des quenchings photochimique (qP) et non-

photochimique (q_N) q_P/q_N , d'une part en diminuant q_P et d'autre part en augmentant q_N . Cela a été observé chez le maïs pour lequel, quand une feuille est exposée à des niveaux de lumière croissants, la proportion de l'énergie lumineuse absorbée qui est dissipée sous forme de chaleur par des processus non radiatifs dans les PS II (q_N) augmente (Baker, 1991). Cette régulation de la photosynthèse par la lumière est stimulée par des conditions de faibles températures qui réduisent la vitesse du métabolisme carboné et, par conséquent, diminue le taux de dissipation de l'énergie d'excitation au profit de la photochimie, q_P (Baker, 1991). Nous l'avons également observé au cours du DEA, en réalisant, au froid, des courbes de réponse de l'assimilation nette de CO_2 et de la fluorescence chlorophyllienne à l'intensité lumineuse incidente (*annexe 4*).

L'augmentation de l'efficacité des processus non photochimiques de dissipation de l'énergie (impliquant notamment le cycle des xanthophylles), rassemblés dans le terme q_N , confère une protection en créant un "puits thermique" pour les photons. Les photons restants sont utilisés dans les réactions photochimiques (q_P) qui dirigent les électrons vers la réduction du CO_2 et de l' O_2 (Osmond *et al.*, 1997). Cela empêche de plus une photoréduction excessive de l' O_2 qui pourrait potentiellement générer un excès de FAO, via la voie ascorbate peroxydase d'Asada ou de Mehler, menant à la photooxydation (Osmond *et al.*, 1997). Peu de différences sont observées entre les réponses des plantes WT et CMSII cultivées sous une même intensité lumineuse de croissance, ce qui différencie ce stress d'un stress oxydant typique (MV).

II.III Récupération et cas du CMS 80 ?

La dernière partie de ce travail a consisté à explorer l'implication éventuelle du transport cyclique autour du PS I dans les réponses au stress appliqué. En effet, son rôle en tant que système de protection vis-à-vis d'un stress oxydant (comme piègeur, puits d'électrons au niveau de la chaîne chloroplastique de transport des électrons) et système permettant une synthèse accrue d'ATP chloroplastique (en produisant un gradient de pH) utilisable pour les mécanismes de réparation a été clairement envisagé (Ducruet *et al.*, 2005).

D'après nos résultats, un transport cyclique des électrons autour du PS I plus important a été observé chez les plantes CMS 80. La production potentiellement accrue en ATP qui peut en découler ne permet toutefois pas à ces plantes CMS 80 de réparer le PS II partiellement détruit par le traitement froid + forte lumière appliqué, le rapport F_v/F_m n'augmentant pas pendant la période de récupération étudiée. Ce transport cyclique des électrons autour du PS I supérieur chez ces plantes comparativement à l'ensemble des autres types de plantes étudiés

pourrait cependant en plus d'augmenter la synthèse d'ATP dans les chloroplastes, limiter la réduction du méthylviologène chez ces plantes et participer à la protection vis-à-vis de la photoinhibition (Heber et Walker, 1992). Ceci pourrait expliquer en partie le niveau de résistance de ces plantes vis-à-vis du stress oxydant induit par le MV et les forts éclairagements.

II.IV Conclusions

Le suivi de la fluorescence chlorophyllienne, du contenu en pigments et protéines ou de la conductivité membranaire montre une plus faible sensibilité des feuilles de plantes CMSII comparativement aux feuilles de WT cultivées dans les mêmes conditions, les différences étant plus marquées pour les plantes cultivées sous faible éclairagement. Deux possibilités ont été envisagées pour tenter d'expliquer la plus forte tolérance obtenue pour les feuilles des plantes CMSII: la présence d'un système antioxydant plus efficace et/ou une plus faible diffusion du méthylviologène dans ces feuilles. En considérant notamment les activités catalase et superoxyde dismutase, les plantes CMSII présentent un système de détoxification des FAO supérieur à celui des plantes WT, pouvant expliquer, au moins en partie, les différents niveaux de tolérance observés vis-à-vis du stress appliqué. Toutefois, malgré une activité antioxydante plus faible chez le CMSII cultivé sous faible éclairagement comparativement aux plantes WT et CMSII cultivées sous plus fort éclairagement, ces plantes présentent un niveau de résistance semblable, les plantes WT cultivées sous faible éclairagement se révélant comme les plus sensibles. La plus faible entrée de méthylviologène (reliée à une plus faible transpiration) pour un temps donné dans les feuilles de CMSII comparativement aux feuilles de WT ne suffit pas à expliquer les différences obtenues. En effet, la concentration en méthylviologène à l'intérieur des feuilles pour laquelle l'assimilation nette de CO₂ et le transport électronique sont affectés apparaît similaire pour les trois types de plantes. Dès lors, ni la capacité du système antioxydant, ni la plus faible diffusion du méthylviologène dans les feuilles ne suffisent à expliquer la plus forte tolérance du CMSII cultivé sous faible éclairagement. Il est à noter également que nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse d'une séquestration plus importante du MV, notamment dans l'apoplaste des cellules des plantes CMSII pour expliquer leur plus grande résistance. En effet, des travaux ont montré l'implication d'une telle séquestration du MV dans la résistance à ce type de stress chez *Hordeum glaucum* (Bishop et al., 1987 ; Powles et Cornic, 1987). Il serait dès lors intéressant de travailler sur organites isolés ou sur protoplastes pour vérifier cette hypothèse.

Conclusions générales et perspectives

L'objectif de ce travail a été l'étude de l'implication de la mitochondrie, et en particulier du complexe I respiratoire, dans les réponses d'une plante à différentes intensités lumineuses de croissance et différents types de contraintes abiotiques associant de fortes intensités lumineuses à un herbicide (le méthylviologène) ou au froid. En effet, de nombreux travaux ont mis en évidence un rôle important des mitochondries végétales à la fois dans l'activité photosynthétique (en relation avec la synthèse d'ATP, la photorespiration et le métabolisme secondaire) et dans l'homéostasie redox cellulaire et par extension dans la réponse aux stress oxydants. Nos travaux vont dans ce sens en montrant (1) l'importance des interactions mitochondries/chloroplastes pour l'acclimatation de l'appareil photosynthétique à une plus forte intensité lumineuse de croissance (le mutant CMSII étant incapable d'ajuster son assimilation nette de CO₂ et ses activités initiales Rubisco et SPS à la lumière de croissance) et (2) l'importance de la mutation dans les réponses au stress puisque les plantes CMSII présentent une plus grande résistance à un stress induit par le méthylviologène.

Ce travail a permis d'associer un défaut d'acclimatation de l'assimilation nette de CO₂ et d'activation des enzymes Rubisco et SPS à une forte intensité lumineuse de croissance, à une plus faible conductance interne du CO₂ chez les plantes CMS 350. Il reste cependant de nombreuses questions relatives au lien entre la mutation et ce défaut de conductance. L'hypothèse privilégiée décrite précédemment (voir la section discussion) concerne les aquaporines, dont un rôle dans le transport du CO₂ est de plus en plus mis en avant. L'identification d'aquaporines chez *Nicotiana sylvestris* dans un premier temps, suivie de l'étude de leur niveau d'expression chez les plantes WT et CMSII, apporteront des réponses très importantes pour la caractérisation de ce mutant CMSII. De plus, le mutant CMSII, cultivé sous deux éclairagements incidents et démontrant une conductance interne très proche malgré une structure foliaire très différente, pourrait constituer un bon outil pour l'étude de la nature exacte de la conductance interne (en dissociant les composantes structurale et métabolique), dont on ne sait en réalité que très peu de choses aujourd'hui.

Le lien entre l'intensité lumineuse de croissance et le niveau de résistance au stress paraît évident pour les plantes WT mais est beaucoup moins marqué pour les CMSII, les CMS 80 présentant un système antioxydant déjà activé presque au niveau de celui des plantes CMS 350. Nous pouvons faire l'exact parallèle avec l'acclimatation à l'intensité lumineuse de croissance, avec des différences réduites entre les plantes CMS 80 et CMS 350. Ainsi, les processus d'acclimatation de l'appareil photosynthétique à la lumière de croissance et de

réponse à un stress méthylviologène présentent peut-être des mécanismes de régulation ou de signalisation communs provenant des mitochondries. Parmi les signaux mitochondriaux candidats, nous pouvons citer les FAO (H_2O_2 ou O_2^- , l'absence de complexe I modifiant l'homéostasie de la chaîne respiratoire) ou l'état rédox du pool d'ubiquinone (par équivalence avec l'état rédox du pool de plastoquinones de la chaîne chloroplastique de transport des électrons, et dont il est connu qu'il peut réguler l'expression de plusieurs gènes chloroplastiques – Allen et al., 1995 – et qui serait à l'origine d'un signal aboutissant à l'augmentation des niveaux de transcrits de certains gènes antioxydants ; Karpinski et al., 1997). En outre, nous pourrions étudier les réponses au stress de plantes cultivées sous fort CO_2 , afin de voir si g_m est impliqué dans cette réponse et/ou dans l'existence d'un système antioxydant plus élevé chez le CMSII.

Dans ce contexte, l'étude de mutants du complexe I d'*Arabidopsis* peut apporter d'importantes informations : en utilisant le fait que l'ensemble du génome ait été décrit pour cette plante et en screenant ce mutant par microrarrays, nous pourrions estimer les niveaux d'expression des gènes antioxydants, des gènes codant pour les aquaporines ou des gènes codant pour des composants du métabolisme photosynthétique et mettre en relation ces résultats avec ceux obtenus au cours de cette thèse chez notre mutant CMSII de *N. sylvestris*.

Enfin, parmi les perspectives plus larges, dépassant le cadre strict de ces travaux de thèse, nous avons concrétisé cette année une seconde collaboration avec l'équipe 'Mitochondrie et Métabolisme' de l'Institut de Biotechnologie des Plantes. L'optique de ces travaux est double : apporter les connaissances et outils de l'écophysiologie pour répondre à certaines interrogations (notamment concernant le mode d'action de la protéine élicitrice, la harpine) et comparer les réponses des plantes à un stress abiotique (méthylviologène) et biotique (réponse hypersensible induite par la harpine). Ces travaux sont présentés à la fin de ce manuscrit et ont permis la rédaction d'un premier projet d'article (voir projet article 4).

Références bibliographiques

Adam A.M., Pike S., Hoyos M.E., Syone J.M., Walker J.C. and Novacky A. (1999). Rapid and Transient Activation of a Myellic Basic Protein Kinase in Tobacco Leaves treated with Harpin from *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.* **115**: 853-861.

Adams W.W. III, Demmig-Adams B., Rosenstiel T.N. and Ebbert V. (2001) Dependence of photosynthesis and energy dissipation activity upon growth form and light environment during the winter. *Photosynth Res.* **67**: 51–62.

Alscher R.G., Donahue J.L. and Cramer C.L. (1997) Reactive oxygen species and antioxidant : relationships in green cells. *Physiol. Plant.*, **100**, 224-233.

Anderson J.M. (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**:93-136.

Anderson J.M., and Osmond C.B. (1987). Shade-sun responses: compromises between acclimation and photoinhibition. In: Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ, eds. *Photoinhibition*, Elsevier, Amsterdam. 1-38.

Anderson J.M., Chow W.S. and Park Y.I. (1995) The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth. Res.* **46**, 129–139.

Aono M., Kubo A., Saji H., Natori T., Tanaka K. and Kondo N. (1991) Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* **32**: 691-697.

Aono M., Kubo A., Saji H., Tanaka K. and Kondo N. (1993) Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant Cell Physiol.* **34**: 129-135.

Arlat M.F., Van Gijsegem F., Huet J.C., Pernollet J.C. and Boucher C.A. (1994). PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO J.* **13**: 543-553.

Aro E-M, Virgin I. and Andersson B. (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inaction, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta*, **1143**, 113-134.

Aro E.M., Suorsa M., Rokka A., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Saleem A., Battchikova N. and Rintamäki E. (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.* **56**: 347 - 356.

Asada K. and Kiso K. (1973) Initiation of aerobic oxidation of sulfite by illuminated spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **33**: 253-257.

Asada K. and Takahashi M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In D. J. Kyle, C. B. Osmond, and C. J. Arntzen (eds.), *Photoinhibition*, Elsevier, Amsterdam, pp. 227-287.

Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 601–639.

Asada K. and Takahashi M. (1987). Production and scavenging of active oxygen species in photosynthesis. *Topics in photosynthesis. Amsterdam.* **9**: 227-287.

Atkin O.K., Evans J.R. and Siebke K. (1998) Relationship between the inhibition of leaf respiration by light and enhancement of leaf dark respiration following light treatment. *Aust. J. Plant Physiol.*, **25**: 437–443.

Atkin O.K., Millar A.H., Gardeström P. and Day D.A. (2000) Photosynthesis, carbohydrate metabolism and respiration in leaves of higher plants. In *RC Leegood, TD Sharkey, S von Caemmerer, eds, Photosynthesis, Physiology and Metabolism. Kluwer Academic Publishers, London.*

Backhausen J.E., Kitzmann C., Horton P. & Scheibe R. (2000) Electron acceptors in isolated chloroplasts act hierarchically to prevent over-reduction and competition for electrons. *Photosynth. Res.* **64**: 1–13.

Baier M. and Dietz K.J. (2005). Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in context of plant physiology. *J. Exp. Bot.* **56**: 1449-1462.

Baiges I., Schöffner A.R., Affenzeller M.J. and Mas A. (2002) Plant aquaporins. *Physiol. Plant.* **115**: 175–182.

Bailey S., Horton P., Walters RG. 2004. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the relationship between photosynthetic function and chloroplast composition. *Planta* **218**: 793-802.

Bailey S., Walters RG., Jansson S., Horton P. 2001. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* **213**: 794-801.

Baker N.R. (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol. Plant.* **81**: 563-570.

Baker C.J., Orlandi E.W. and Mock N.M. (1993). Harpin, an Elicitor of the Hypersensitive Response in Tobacco Caused by *Erwinia amylovora*, Elicits Active Oxygen Production in Suspension Cells. *Plant Physiol.* **102**: 1341-1344.

Bao X., Focke M., Pollard M. and Ohlrogge J. (2000) Understanding in vivo carbon precursor supply for fatty acid synthesis in leaf tissue. *Plant J.* **22**: 39–50.

Barney M.A. (1995). *Erwinia amylovora hrpN* mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plant and elicit variable hypersensitive reactions in tobacco. *Europ. J. of Plant Pathology* **101**: 333-340.

Besse I. and Buchanan B.B. (1997) Thioredoxin-linked plant and animal processes: the new generation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **38**: 1–11.

Bishop T., Powles S.B. and Cornic G. (1987) Mechanism of paraquat resistance in *Hordeum glaucum*. I. Paraquat uptake and translocation. *Aust. J. Plant Physiol.* **14**: 539-547.

Björkman O. (1968) Carboxydismutase activity in shade-adapted and sun-adapted species of higher plants. *Physiol. Plant.* **21**: 1–10.

Björkman O. (1981) Responses to different quantum flux densities. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 12A, O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Zeigler, eds., Springer, Berlin, pp. 57–107.

Bowes G., Ögren W.L. and Hageman R.H. (1971) Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**(3): 716-722.

Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M. and Inzé D. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Plant Sci.* **13**: 199-218.

Bradford M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **7**, 248-254.

Braidot E., Petrusa E., Vianello A., Macri F. (1999) Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing Complex I or Complex II substrates. *FEBS Lett.* **451**: 347-350.

Brandt U., Kerscher S., Dröse S., Zwicker K., and Zickermann V. (2003). Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Lett.* **545**: 9-17.

Brangeon J., Sabar M., Gutierrez S., Combettes B., Bove J., Gendy C., Chétrit P., Des Francs-Small C.C., Pla M., Vedel F. and De Paepe R. (2000) Defective splicing of the first nad4 intron is associated with lack of several complex I subunits in the *Nicotiana sylvestris* NMS1 nuclear mutant. *Plant J.* **21**: 269–280.

Brooks A. and Farquhar G.D. (1985) Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. Estimates from gas-exchange measurements on spinach. *Planta* **165**: 397–406.

- Bruggemann W.** (1992) Low-temperature limitations of photosynthesis in three tropical *Vigna* species: a chlorophyll fluorescence study. *Photosynth. Res.* **34**: 301-310.
- Brugnoli E. and Farquhar G.D.** (2000) Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In RC Leegood, TD Sharkey and S von Caemmerer, eds, *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 399-434.
- Buchanan B.B.** (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31** : 341–374.
- Buchanan B.B., Gruissen W. and Jones R.L.** (2002) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Soc. of Plant Physiologists*, Rockville, Maryland USA, p. 1367.
- Butler W.L. and Kijatima M.** (1975). Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. Fluorescence measurement, quenching, model of the fluorescence yield. *Biochim. Biophys. Acta* **376**, 116-125.
- Canvin D.T.; Berry J.A.; Badger M.R., Fock H. and Osmond C.B.** (1980) Oxygen exchange in leaves in the light. *Plant Physiol.* 1980 **66**(2): 302–307.
- Carol P. & Kuntz M.** (2001) A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci.* : **6**, 31–36.
- Chang C.C., Ball L., Fryer M.J., Baker N.R., Karpinski S. and Mullineaux P.M.** (2004). Induction of ASCORBATE PEROXIDASE 2 expression in wounded Arabidopsis leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant J.* **38**: 499-511.
- Chétrit P., Rios R., De Paepe R., Vitart T., Gutierrez S. and Vedel F.** (1992) Cytoplasmic male sterility is associated with large deletions in the mitochondrial DNA of two *Nicotiana glauca* protoclones. *Curr. Genet.*, **21**, 131-137.
- Chow W.S. and Hope A.B.** (1987) The stoichiometries of supramolecular complexes in spinach chloroplasts. *Aust. J. Plant Physiol.* **14**: 21–28.

Chow W.S., Hope A.B. and Anderson J.M. (1991) Further studies on quantifying photosystem II in vivo by flash-induced oxygen yield from leaf discs. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**: 397–410.

Conley C.A. and Hanson M.R. (1994). Tissue-specific protein expression in plant mitochondria. *Plant Cell* **6**, 85–91.

Cooper GJ, Boron WF. (1998) Effect of PCMBs on CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant. *Am. J. Physiol.* **275**(6): 1481-1486.

Cornic G. (1976) Effet exercé sur l'activité photosynthétique du *Sinapis alba* L. par une inhibition temporaire de la photorespiration dans un air sans CO₂. *CR Acad. Sci. Ser. D.* **282** : 1955-1958.

Cornic G. and Massacci A. (1996) Leaf photosynthesis under drought stress. *In: Photosynthesis and the Environment* (ed. Baker N.R.), pp 347-366, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Cournac L., Redding K., Ravenel J., Rumeau D., Josse E.M., Kuntz M. & Peltier G. (2000) Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J. Biol. Chem.* **275**, 17256–17262.

Cowan I.R. (1986). Economics of carbon fixation in higher plants. *In* On the economy of plant form and function. T. J. Givnish Eds. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp 133-170.

Craig H. (1954) Carbon 13 in plants and the relationship between carbon 13 and carbon 14 variations in nature. *J. Geol.* **62**: 115-149.

Dangl J.L., Dietrich R.A., Richberg M.H. (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807.

Davies E.C., Chow W.S., LeFay J.M. and Jordan B.R. (1986) Acclimation of tomato leaves to changes in light intensity: effects on the function of the thylakoid membrane. *J. Exp. Bot.* **37**: 211-220.

Deisseroth A. and Dounce A.L. (1970) Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological roles. *Physiological Rev.* **50**, 319-373.

de la Torre W.R. and Burkey K.O. (1990a) Acclimation of barley to changes in light-intensity: chlorophyll organization. *Photosynt. Res.* **24**, 117–125.

de la Torre W.R. and Burkey K.O. (1990b) Acclimation of barley to changes in light-intensity: photosynthetic electron-transport activity and components. *Photosynt. Res.* **24**, 127–136.

Delieu T. and Walker D.A. (1981) Polarographic measurement of photosynthetic measurement of photosynthetic O₂ evolution by leaf discs. *New Phytol.* **89**: 165-178.

De Lucia E.H., Whitehead D. and Clearwater M.J. (2003) The relative limitation of photosynthesis by mesophyll conductance in cooccurring species in a temperate rainforest dominated by the conifer *Dacrydium cupressinum*. *Funct. Plant Biol.* **30**, 1197–1204.

Demmig-Adams B. and Adams W.W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **43**, 599-626.

Demmig-Adams B. and Adams W.W. (1996) The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* **1**: 17–24.

Desagher S. and Martinou J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **10**: 369-377.

Dizengremel P., Sasek T.W., Brown K.J. and Richardson C.J. (1994) Ozone-induced changes in primary carbon metabolism enzymes of loblolly pine needles. *J. Plant Physiol.* **144**: 300-306.

Dodge A. (1994) Herbicide action and effects on detoxification processes. *In* Causes of photoactive stress and amelioration of defense systems in plants (Foyer, C.H. and Mullineaux, P.M., Eds), pp. 219-236, CRC, Boca Raton, FL.

Donahue J.L., Okpodu C.M., Cramer C.L., Grabau E.A. and Alscher R.G. (1997) Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. *Plant Physiol.* **113**: 249-257.

Ducruet J.M., Roman M., Havaux M., Janda T. and Gallais A. (2005). Cyclic electron flow around PSI monitored by afterglow luminescence in leaves of maize inbred lines (*Zea mays* L.) : correlation with chilling tolerance. *Planta.* 567-579.

Duranceau M., Ghashghaie J. and Brugnoli E. (2001) Carbon isotope discrimination during photosynthesis and dark respiration in intact leaves of *Nicotiana sylvestris*: comparisons between wild type and mitochondrial mutant plants. *Austr. J. Plant. Physiol.* **28**(1) 65-71.

Durnford D.G. and Falkowski P.G. (1997) Chloroplast redox regulation of nuclear gene transcription during photoacclimation. *Photosynt. Res.* **53**, 229–241.

Dutilleul C. (2003) Répercussions d'un défaut mitochondrial sur les interactions subcellulaires dans le métabolisme foliaire: analyse d'un mutant respiratoire de *Nicotiana sylvestris*. *Thèse de Doctorat*, Université Paris Sud, Orsay, France. 196 p.

Dutilleul C., Driscoll S., Cornic G., Foyer CH., De Paepe R., Noctor G. (2003a). Tobacco leaves require functional mitochondrial complex I for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiol.* **131**, 264-275.

Dutilleul C., Garmier C., Noctor G., Mathieu C., Chétrit P., Foyer CH., De Paepe R. (2003b). Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* **15**, 1212-1226.

Dutilleul C., Lelarge C., Prioul J-L, De Paepe R., Foyer C.H. and Noctor, G. (2005) Mitochondria-Driven Changes in Leaf NAD Status Exert a Crucial Influence on the Control of Nitrate Assimilation and the Integration of Carbon and Nitrogen Metabolism. *Plant Physiol.* **139**, 64-78.

El-Maarouf H., Barny M.-A., Rona J.P. and Bouteau F. (2001). Harpin, a hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett.* **497**: 82-84.

Elthon T.E., Nickels R.L., McIntosh L. (1989) Mitochondrial events during development of thermogenesis in *Sauromatum guttatum* (Schott). *Planta.*, **180**, 82–89.

Epron D., Godard D., Cornic G. and Genty, B. (1995) Limitation of net assimilation rate by internal resistance to CO₂ transfer conductance in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant Cell. Environ.* **13**, 43–51.

Escoubas J.M., Lomas M., Laroche J. and Falkowski P.G. (1995) Light-intensity regulation of *cab* gene-transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10237-10241.

Evans J.R., Sharkey T.D. Berry J.A. & Farquhar G.D. (1986) Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO₂ diffusion in leaves of higher plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**, 281-292.

Evans J.R., von Caemmerer S., Setchell B.A. and Hudson G.S. (1994) The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Aust. J. Plant Physiol.* **21**, 475–495.

Evans J.R. (1999). Leaf anatomy enables more equal access to light and CO₂ between chloroplasts. *New Phytol.* **143**: 93-104.

Evans J.R. and Poorter H. (2001). Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant Cell Environ.* **24**:755-767.

Evans J.R., Terashima I., Hanba Y. and Loreto F. (2004) CO₂ capture by the leaf. *In*. Photosynthetic adaptation: chloroplast to landscape. Springer. pp.107-132.

Farquhar G.D. (1979) Models describing the kinetics of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **193**(1): 456-468.

Farquhar G.D., von Caemmerer S. and Berry J.A. (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**, 78–90.

Farquhar G.D., O'Leary M.H. and Berry J.A. (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. of Pl. Physiol.* **9**, 121–137.

Farquhar G. and Sharkey T.D. 1982 Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**, 317-345.

Farquhar G.D. and von Caemmerer, S. (1982) Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. *In*: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H. , editors; Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H. , editors. Encyclopedia of Plant Physiology. 12B. Physiological Plant Ecology II. Water Relations and Carbon Assimilation. Berlin: Springer Verlag. 551–587.

Farrington J.A., Ebert M., Land E.J. and Fletcher K. (1973) Bipyridylium quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochim. et Biophys. Acta* **314**, 372–381.

Feierabend J., Schaan C. and Hertwig B. (1992) Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low- temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiol.*, **100**, 1554-1561.

Feierabend J., Streb P., Schmidt M., Dehne S. and Shang, W. (1996) Expression of Catalase and its Relation to Light Stress and Stress Tolerance. *Physical Stresses in Plants.*, 223-234.

Finazzi G., Zito F., Barbagallo R.P. and Wollman F.A. (2001) Contrasted effects of inhibitors of cytochrome *b₆f* complex on state transitions in *C. reinhardtii*: the role of Qo site occupancy in LHCII-kinase activation. *J. Biol. Chem.* **276**: 9770–9774.

Foyer C.H. and Mullineaux P. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.*, **92**, 696-717.

Foyer C.H. (1997) Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In JG Scandalios, ed, *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 587-621.

Galàn J.E. and Collmer A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322-1328.

Garmier M. (2003) Implication de la mitochondrie végétale dans l'état rédox cellulaire et la réponse au stress biotique. *Thèse de Doctorat*, Université Paris Sud, Orsay, France. 196 p.

Garmier M., Dutilleul C., Matthieu C., Chétrit P., Boccara M., De Paepe R. (2003) Changes in antioxidant expression and harpin induced hypersensitive response in a *Nicotiana sylvestris* mitochondrial mutant. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 561-566.

Gaston S., Ribas-Carbo M., Busquets S., Berry J.A., Zabalza A. and Royuela M. (2003) Changes in mitochondrial electron partitioning in response to herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis in soybean. *Plant Physiol.*, **133**: 1351–1359.

Genty B., Briantais JM., Baker NR. (1989). The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. et Biophys. Acta* **990**, 87-92.

Ghashghaie J., Cornic G. (1994). Effect of temperature on partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ assimilation and O₂ reduction and on the CO₂/O₂ specificity of Rubisco. *J. of Plant Physiol.* **143**, 643-650.

Gillham D.J. and Dodge A.D. (1987) Chloroplast superoxide and hydrogen peroxide scavenging systems from pea leaves: seasonal variations. *Plant Sci.* **50**: 105-109.

Gilmour S.J., Sebolt A.M., Salazar M.P., Everard J.D. and Thomashow M.F. (2000) Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.* **124**: 1854-1865.

Grahl H. and Wild A.(1973) Lichtinduzierte Veränderungen im Photosynthese-Apparat von *Sinapis alba*. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **86**: 341-349.

Grignon C., Sentenac H. (1991). pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 103-128.

Grohmann L., Rasmusson A.G., Heiser V., Thieck O. and Brennicke A. (1996). The NADHbinding subunit of respiratory chain complex I is nuclear-encoded in plants and identified only in mitochondria. *Plant J.* **10**: 793-803.

Gu J., Miles D. and Newton K.J. (1993) Analysis of leaf sectors in the NCS6 mitochondrial mutant of maize. *Plant Cell* **5**: 963–971.

Gutierrez S., Sabar M., Lelandais C., Chétrit P., Diolez P., Degand H., Boutry M., Vedel F., de Kouchkovsky Y. De Paepe R. (1997). Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alterations of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3436-3441.

Gutierrez S., Combettes B., De Paepe R., Mirande M., Lelandais C., Vedel F. and Chétrit P. (1999) In the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant, a recombination-mediated change 5' to the first exon of the mitochondrial *nad1* gene is associated to lack of the NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) NAD1 subunit. *Eur. J. Biochem.* **261**: 361–370.

Guy C., Haskell D., Neven L., Klein P. and Smelser C. (1992) Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta* **188**: 265-270.

Guy R.D., Fogel M.L. and Berry J.A. (1993) Photosynthetic fractionation of the stable isotopes of oxygen and carbon. *Plant Physiol.* **101**: 37-47.

Hanba Y.T., Miyazawa S.-I. and Terashima I. (1999) The influence of leaf thickness on the CO₂ transfer conductance and leaf stable carbon isotope ratio for some evergreen tree species in Japanese warmtemperate forests. *Funct. Ecol.* **13**, 632–639.

Hanba Y.T, Kogami H. and Terashima I. (2002) The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. *Plant Cell. Environ.* **25**(8): 1021-1030.

Hanba Y.T., Shibasaka M., Hayashi Y., Hayakawa T., Kasamo K., Terashima I. & Katsuhara M. (2004) Overexpression of the Barley Aquaporin HvPIP2;1 Increases Internal CO₂ Conductance and CO₂ Assimilation in the Leaves of Transgenic Rice Plants. *Plant Cell Physiol.*, **45**: 521-529.

Harris N. and Dodge A.D. (1972) The effect of paraquat on flax cotyledon leaves: physiological and biochemical changes. *Planta* **104**: 210–219.

Harvey G.W. (1979) Photosynthetic performance of isolated leaf cells from sun and shade plants. *Carnegie Inst. Washington Yearbook* **79**: 161–164.

Havaux, M. and Niyogi, K.K. (1999). The violaxanthin cycle protects plants from photo-oxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 8762-8767.

He S.Y., Huang H.C. and Collmer A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell.* **73**: 1255-1266.

He S Y, Bauer DW, Collmer A and Beer SV (1994). Hypersensitive Response Elicited by *Erwinia amylovora* Harpin Requires Active Plant Metabolism. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **7**: 289-292.

Heazlewood J.L., Howell K.A. and Millar A.H. (2003). Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plantspecific subunits. *Biochim Biophys Acta*. **1604**: 159-169.

Heber U. and Walker D. (1992) Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol.* **100**, 1621–1626.

Heldt H.W., Chon C.J. and Lorimer G.H. (1978) Phosphate requirement for the light activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in intact spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* **92**: 234–240.

Heldt H.W. (1979) Light-dependent changes of stromal H⁺ and Mg⁺² concentration controlling O₂ fixation. *In*: Gibbs M, Latzko E., editors. Encyclopedia of Plant Physiology. 6: Photosynthesis II. Berlin: Springer-Verlag; pp. 202–207.

Hincha D.K. (1994). Rapid induction of frost hardiness in spinach seedlings under salt stress. *Planta* **194**, 274-278.

Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F. and Prange R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxydation in plant tissue containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**, 604-611.

Hoefnagel HN., Atkin OK., Wiskich JT. (1998). Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochim. et Biophys. Acta* **1366**, 235-255.

Horton P., Ruban A.V. and Walters R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:655–684.

Huner NPA., Öquist G. and Sahrn F. (1998). Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci.* **3**, 224-230.

Hurry V.M., Toblæson M., Krömer S., Gardeström P., Öquist G. (1995). Mitochondria contribute to increased photosynthetic capacity of leaves in winter rye (*Secale cereale* L.) following cold-hardening. *Plant Cell. Environ.* **18**, 69-76.

Igamberdiev A.U., Bykova N.V. and Gardeström P. (1997) Involvement of cyanide-resistant and rotenone-insensitive pathways of mitochondrial electron transport during oxidation of glycine in higher plants. *FEBS Lett.* **412**: 265–269.

Igamberdiev A.U. and Gardeström P. (2003) Regulation of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleosides in mitochondria and cytosol of Pea leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, **1606**: 117–125.

Im C.S. and Grossman A.R. (2002) Identification and regulation of high light-induced genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant J.* **30**, 301–313.

Joët T., Cournac L., Peltier G. and Havaux M. (2002) Cyclic electron flow around photosystem I in C3 plants: in vivo control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NDH complex. *Plant Physiol.* **128**, 760-769.

Jordan D.B. and Ogren W.L. (1981) Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature* **291**, 513–515.

Josse E.-M. (2003) Caractérisation d'une oxydase terminale plastidiale impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes et dans la réponse au stress. *Thèse de Doctorat*, Université Joseph Fourier, Grenoble, France. 164 p.

Josse E.M., Alcaraz J.P., Labouré A.M. and Kuntz M. (2003). *In vitro* characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX). *Eur. J. Biochem.* **270**: 3787–3794.

Kaiser W.M. (1979). Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplast by hydrogen peroxide. *Planta* **145**, 377–382.

Kaldenhoff and Eckert (1999) Features and functions of plant aquaporins. *J. of Photochem. And Photobiol. B-Biology* **52**: 1-6.

Kane H.J., Viil J., Entsch B., Paul K., Morell M.K. and Andrews T.J. 1994 An improved method for measuring the CO₂/O₂ specificity of ribulosebiphosphate carboxylase-oxygenase. *Aust. J.Plant Physiol.* **21**, 449-461.

Karpinski S., Escobar C., Karpinska B., Creissen G. and Mullineaux P.M. (1997). Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* **4**: 627-640.

Kautsky H. and Hirsh A. (1931). Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* **19**, 964.

Kearns A., Whelan J., Young S., Elthon T.E. and Day D.A. (1992) Tissue-specific expression of the alternative oxidase in soybean and siratro. *Plant Physiol.* **99**: 712-717.

Kettunen R., Tyystjärvi E. and Aro E-M. (1991) D1 protein degradation during photoinhibition of intact leaves. *FEBS Lett.*, **290**: 153-156.

Kijatima M. and Butler W.L. (1975). Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* **376**, 105-115.

Kogami H., Hanba Y.T., Kibe T., Terashima I., Masuzawa T. (2001) CO₂ transfer conductance, leaf structure and carbon isotope composition of *Polygonum cuspidatum* leaves from low and high altitudes. *Plant Cell. Environ.* **24**, 529–538.

Kok B. (1948) A critical consideration of the quantum yield of Chlorella photosynthesis. *Enzymologia*, **13**: 1–56.

Kozaki A. and Takeba G. (1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* **384**: 557-560.

Krömer S., Stitt M. and Heldt H.W. (1988) Mitochondrial oxidative phosphorylation participating in photosynthetic metabolism of a leaf cell. *FEBS Lett.* **226**: 352–356.

Krömer S. (1995). Respiration during photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 45-70.

Kruse E., Uehlein N. and Kaldenhoff R. (2006) The aquaporins. *Genome Biology*, **7**: 206.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laing W.A., Ogren W.L. and Hageman R.H. (1974) Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂, and ribulose-1,5-diphosphate carboxylase. *Plant Physiol.* **54**, 678–685.

Laisk A.K. (1977) Kinetics of Photosynthesis and Photorespiration in C₃ Plants. *Nauka, Moscow*.

Lam E., Kato N., and Lawton M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**: 848-853.

Lambers H. (1982). Cyanide resistant respiration: A non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiol. Plant.* **55**, 478-485.

Lauer M., Knudsen C., Newton K.J., Gabay-Laughnan S. and Laughnan J.R. (1990) A partially deleted mitochondrial cytochrome oxidase gene in the NCS6 abnormal growth mutant of maize. *New Biol.*, **2**(2): 179–186.

Lee W.J. and Whitmarsh J. (1989) The photosynthetic apparatus of pea thylakoid membranes: Response to growth light intensity. *Plant Physiol.* **89**: 932-940.

Lee B-H., Lee H., Xiong L. and Zhu J-K. (2002). A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell*, **14**, 1235-1251.

Lelandais C. Albert B. Gutierrez S. De Paepe R. Godelle B. Vedel F. and Chetrit P. (1998). Organization and expression of the mitochondrial genome in the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant. *Genetics*. **150**: 873-882.

Leong T.Y. and Anderson J.M. (1984a) Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities 1. Study on the distribution of chlorophyll–protein complexes. *Photosynth. Res.* **5**, 105-115.

Leong T.Y. and Anderson J.M. (1984b) Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities 2. Regulation of electron-transport capacities, electron carriers, coupling factor (cF1) activity and rates of photosynthesis. *Photosynth. Res.* **5**, 117-128.

Levine A., Pennell R.I., Alvarez M.E., Palmer R. and Lamb C. (1996). Calcium-mediated apoptosis in plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* **6**: 427-437.

Li X.Q., Chétrit P., Matthieu C., Vedel F., De Paepe R., Remy R. and Ambard-Bretteville F. (1988) Regeneration of cytoplasmic male sterile protoclones of *Nicotiana sylvestris* with mitochondrial variations. *Curr. Genet.*, **13**, 261-266.

Lloyd J., Syvertsen J.P., Kriedemann P.E. and Farquhar G.D. (1992) Low conductances for CO₂ diffusion from stomata to the sites of carboxylation in leaves of woody species. *Plant Cell. Environ.* **15**, 873–899.

Long S.P., Humphries S. and Falkowski P.G. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 633–662.

Lorenzini, G., Stringari, S. and Nali, C. (2002) The absence of cross tolerance between ozone and paraquat: the case of *Conyza bonariensis*. *Phyton (Horn, Austria)*, **42**.

Loreto F., Harley P.C., Di Marco G. and Sharkey T.D. (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO₂ flux by three different methods. *Plant Physiol.* **98**, 1437–1443.

Lorimer G.H. (1981) The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate. The primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**: 349-383.

Madore M. and Grodzinski B. (1984) Effect of oxygen concentration on ¹⁴C-photoassimilate transport from leaves of *Salvia splendens* L. *Plant Physiol.* **76**, 782-786.

Marienfeld J.R. and Newton K.J. (1994): The maize NCS2 abnormal growth mutant has a chimeric *nad4- nad7* mitochondrial gene and is associated with reduced complex I function. *Genetics* **138**, 855-863.

Mateo A., Muhlenbock P., Rusterucci C., Chang C.C., Miszalski Z., Karpinska B., Parker J.E., Mullineaux P.M. and Karpinski S. (2004). LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol* **136**: 2818-2830.

Maxwell D.P., Falk S., Trick C.G. and Huner N.P.A. (1994) Growth at low temperature mimics high light acclimation in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* **105**, 535–543.

Maxwell D.P., Laudenbach D.E. and Huner NPA (1995) Redox regulation of light-harvesting complex II and *cab* mRNA abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* **109**: 787-795.

Maxwell D.P., Wang Y. and McIntosh L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8271-8276.

Maxwell K. and Johnson G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J. Exp. Bot.* **51**(345), 659-668.

McIntosh L., Eichler T., Gray G., Maxwell D., Nickels R., Wang Y. (1998) Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 278-284.

McMurtrie R.E. and Wang Y.-P. (1993) Mathematical models of the photosynthetic response of tree stands to rising CO₂ concentrations and temperatures. *Plant Cell. Environ.* **16**: 1-13.

Millar H., Considine M.J., Day D.A. and Whelan J. (2001) Unraveling the role of mitochondria during oxidative stress in plants. *IUBMB Life*, **51**, pp. 201-205.

Minagawa N., Koga S., Nakano M., Sakajo S. and Yoshimoto A. (1992) Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett.* **302**: 217–219.

Miyagawa Y., Tamoi M. and Shigeoka S. (2000) Evaluation of the defense system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* **41**(3), 311-320.

Møller I.M. (1997). The oxidation of cytosolic NAD(P)H by external NAD(P)H dehydrogenases in the respiratory chain of plant mitochondria. *Physiol. Plant.* **100**: 85-90.

Møller I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 561-591.

Montillet J.-L., Chamnongpol S., Rusterucci C., Dat J., van de Cotte B., Agnel J.-P., Battesti C., Inze D., Van Breusegem F. and Triantaphylides C. (2005) Fatty Acid Hydroperoxides and H₂O₂ in the Execution of Hypersensitive Cell Death in Tobacco Leaves. *Plant Physiol.*, **138**: 1516-1526.

Moroney J.V., Bartlett S.G. and Samuelsson G. (2001) Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell. Environ.* **24**: 141–153.

Müller P., Li X.P. and Niyogi K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* **125**: 1558–1566.

Murchie E.H. and Horton P. (1997) Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. *Plant Cell. Environ.* **20**, 438-448.

Murchie E.H., Hubbart S., Chen Y., Peng S. and Horton P. (2002). Acclimation of Rice photosynthesis to irradiance under field conditions. *Plant Physiol.* **130**, 1999-2010.

Nakano Y. and Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **22**, 867-880.

Nakhoul N.L., Davis B.A., Romero M.F. and Boron W.F. (1998). Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **43**: 543-548.

Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D. and Hancock J.T. (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.*, **53**: 1237-1247.

Newton K.J., Knudsen C., Gabay-Laughnan S. and Laughnan J.R. (1990). An abnormal growth mutant in maize has a defective mitochondrial cytochrome oxidase gene. *Plant Cell.* **2**: 107-113.

Niyogi K. K. (1999). Photoprotection revisited : genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**: 333-359.

Niyogi K.K. (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr. Op. in Plant Biol.* **3**, 455–460.

Ort D.R. and Baker N.R. (2002) A photoprotective role of O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Curr. Opinion in Plant Biol.* **5**, 193–198.

Nobel P.S. (1991) Physicochemical and Environmental Plant Physiology. *Academic Press*, San Diego, CA.

Noctor G., Arisi A., Jouanin L., Kunert K., Rennenberg H. and Foyer C. (1998) Review article. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.*, **49**, 623-647.

Noctor G. and Foyer C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**:249-279.

Noctor G., Arisi A., Jouanin L. and Foyer C. (1999) Photorespiratory glycine enhances glutathione accumulation in both the chloroplastic and cytosolic compartments. *J. Exp. Bot.*, **50**, 1157-1167.

Osmond C.B. (1981) Photorespiration and photoinhibition. *Biochim. Biophys. Acta* **639**: 77-98.

Osmond C.B., Badger M., Maxwell K., Björkman O. and Leegood R.C. (1997) Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci.* **2**:119–121.

Oswald O., Martin T., Dominy P.J. and Graham I.A. (2001) Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2047–2052.

Padmasree K. and Raghavendra A.S. (1999) Importance of oxidative electron transport over oxidative phosphorylation in optimizing photosynthesis in mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum* L.). *Physiol. Plant.* **105**, 546–553.

Padmasree K. and Raghavendra A.S. (2000) Photorespiration and interaction between chloroplasts, mitochondria and peroxisomes. In *Probing Photosynthesis. Mechanisms, Regulation and Adaptation* (Yunus, M. et al., eds), pp. 246–261, Taylor & Francis.

Padmasree K., Padmavathi L. and Raghavendra A.S. (2002). Essentiality of mitochondrial oxidative metabolism for photosynthesis: optimization of carbon assimilation and protection against photoinhibition. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 71-119.

Park Y.I., Chow W.S., Anderson J.M. and Hurry V.M. (1996) Differential susceptibility of photosystem II to light stress in light-acclimated pea leaves depends on the capacity for photochemical and nonradiative dissipation of light. *Plant Sci.* **115**: 137-149.

Parkhurst D.F. and Mott K.A. (1990) Intercellular diffusion limits to CO₂ uptake in leaves. *Plant Physiol.* **94**, 1024–1032.

Pedersen P. L. (1999) Mitochondrial Events in the Life and Death of Animal Cells: a Brief Overview. *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **31**, 291-304.

Peisker M. (1978) Der Einfluß Von Sauerstoff auf die CO₂-Kompensationskonzentration Von C3- und C4-Pflanzen und Von Intermediärformen. *Kulturpflanze* **26**: 81–98.

Peisker M. and Apel P. (1980) Dark respiration and the effect of oxygen on CO₂ compensation concentration in wheat leaves. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **100**: 389–395.

Peisker M. and Apel H. (2001) Inhibition by light of CO₂ evolution from dark evolution: comparison of two gas exchange methods. *Photosynth. Res.*, **70**: 291–298.

Peixoto F., Vicente J. and Madeira V.M. (2004) A comparative study of plant and animal mitochondria exposed to paraquat reveals that hydrogen peroxide is not related to the observed toxicity. *Toxicol. In Vitro* **18**: 733-739.

Peltier G. and Thibault P. (1985) O₂ uptake in the light in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **79**: 225–230.

Peltier G. and Cournac L. (2002) Chlororespiration. *Annu. Rev. of Plant Biol.* **53**: 523–550.

Pennel R.I., and Lamb C. (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* **9**: 1157-68.

Perl A., Perl-Treves R., Galili S., Aviv D., Shalgi E., Malkin S. and Galun E. (1993) Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxide dismutases. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 568-576.

Pfannschmidt T., Nilsson A. and Allen J.F. (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**, 625-628.

Pfannschmidt T., Nilsson A.N., Tullberg A., Link G. and Allen J.F. (2000) Photosynthesis as regulator of plant gene expression. *Biol. Chem.* **381**, Spec. Suppl. 63-67.

Pfannschmidt T., Allen J.F. and Oelmüller R. (2001a) Principles of redox control in photosynthesis gene expression. *Physiol. Plant.* **112**, 1-9.

Pfannschmidt T., Schütze K., Brost M. and Oelmüller R. (2001b) A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment. *J. Biol. Chem.* **276**, 36125-36180.

Pfannschmidt T. (2003). Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.* **8**, 33-41.

Pfannschmidt T., Schütze K., Fey V., Sherameti I. and Oelmüller R. (2003) Chloroplast redox control of nuclear gene expression – a new class of plastid signals in interorganellar communication. *Antioxid. Redox. Signal.* **5**, 95-101.

Pfanz H., Dietz K.J. (1986). A fluorescence method for the determination of the apoplastic proton concentration in intact leaf tissues. *J. Plant Physiol.* **129**: 41-48.

Pfanz H. (1995). Apoplastic and symplastic proton concentrations and their significance for metabolism. In *Ecophysiology of photosynthesis*. M. M. C. E.D. Schulze Eds. Springer Verlag. pp 103-122.

Pike S.M., Adam A.L., Pu X.A., Hoyos M.E., Laby R., Beer S.V. and 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*. *Physiol. And Mol. Plant Pathology* **53**: 39-60.

Pineau B., Mathieu C., Gerard-Hirne C., De Paepe R. and Chétrit P. (2005). Targeting the NAD7 subunit to mitochondria restores a functional complex I and a wild type phenotype in the *Nicotiana sylvestris* CMS II mutant lacking nad7. *J Biol. Chem.* **280**: 25994-26001.

Pitcher L.H. and Zilinskas B.A. (1996) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiol.* **110**: 583-588.

Pla M., Matthieu C., De Paepe R., Chétrit P. and Vedel F. (1995) Deletion of the last two exons of the mitochondrial *nad7* gene results in lack of the NAD7 polypeptide in a *Nicotiana sylvestris* CMS mutant. *Mol. Gen. Genet.*, **248**, 279-288.

Polle A. (1997). Defense against photo-oxidative damage in plants. *In: Scandalios JG, ed. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 623–666.

Popham P.L., Pike S. and Novacky A. (1995). The effect of harpin from *Erwinia amylovora* on the plasmalemma of suspension-cultured tobacco cells. *Physiol. And Mol. Plant Pathology* **47**: 39-50.

Porra R.J., Thompson W.A. and Kriedemann P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. et Biophys. Acta* **975**, 384-394.

Powles S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **35**, 15-44.

Powles S.B. and Cornic G. (1987) Mechanism of paraquat resistance in *Hordeum glaucum*. II. Studies with isolated organelles and enzymes. *Aust. J. Plant Physiol.* **14**: 81-89.

Preston G., Huang H.C., He S.Y. and Collmer A. (1995). The HrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae*, *glycinea*, and tomato are encoded by an operon containing *Yersinia ysc* homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not soybean. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 717-732.

Priault, P. (2002) Implication d'un défaut mitochondrial dans les réponses à un stress de type forte lumière ou froid chez *Nicotiana sylvestris*. *mémoire de DEA*.

Price G.D., von Caemmerer S., Evans J.R., Siebke K., Anderson J.M. and Badger M.R. (1998) Photosynthesis is strongly reduced by antisense suppression of chloroplastic cytochrome *b/f* complex in transgenic tobacco. *Aust. J. Plant Physiol.* **25**: 445-452.

Purvis A.C. (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol. Plant.*, **100**: 165–170.

Quick W.P., Schurr U., Fichtner K., Schulze E.D., Rodermeil S.R., Bogorad L. and Stitt M. (1991) The impact of decreased rubisco on photosynthesis, growth, allocation and storage in tobacco plants which have been transformed with antisense rbcS. *The Plant J.* **1**, 51–58.

Raghavendra A.S. and Padmasree K. (2003) Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci.* **8**: 546-553.

Rhoads D.M. and McIntosh L. (1992) Salicylic Acid Regulation of Respiration in Higher Plants: Alternative Oxidase Expression. *Plant Cell.* **9**:1131-1139.

Rhoads D.M. (1993) Salicylic acid-inducible alternative oxidase gene *aox1* and genes encoding pathogenesis-related proteins share regions of similarity in their promoters. *Plant Mol. Biol.* **21**, 615–624.

Rhoads D.M. and McIntosh L. (1993) Cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco: effects of salicylic acid. *Plant Physiol.*, **103**: 877–883.

Ribas-Carbo M., Taylor N.L., Giles L., Busquets S., Finnegan P.M., Day D.A., Lambers H., Medrano H., Berry J.A. and Flexas J. (2005) Effects of Water Stress on Respiration in Soybean Leaves. *Plant Physiol.*, **139**, 466-473.

Roeske C.A. and O’Leary M.H. (1984) Carbon isotope effects on the enzyme-catalyzed carboxylation of ribulose biphosphate. *Biochemistry* **23**: 6275-6284.

Rolland F., Moore B. and Sheen J. (2002) Sugar Sensing and Signalling in Plants. *Plant Cell*, **14**: 185-205.

Rusterucci C., Montillet J.L., Agnel J.P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J.J., Etienne P., Suty L., Blein J.P. and Triantaphylides C. (1999). Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein in tobacco leaves. *J Biol Chem* **274**: 36446-55.

Ryerson D.E. and Heath M.C. (1980) Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* **8**: 393–402.

Sabar M., De Paepe R. and De Kouchkovsky Y. (2000). Complex I impairment, respiratory compensations, and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol.* **124**, 1239-1249.

Saccardy K. (1997) Effets de la contrainte hydrique sur le mécanisme photosynthétique des plantes C4. Interaction avec les fortes lumières. *Thèse de Doctorat*, Université Paris Sud – Orsay. 70 p.

Salvucci M.E. and Ögren W. (1996) The mechanism of Rubisco activase: insights from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynth. Res.* **47**: 1–11.

Saradadevi K. and Raghavendra A.S. (1992) Dark respiration protects photosynthesis against photoinhibition in mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.* **99**, 1232–1237.

Savitch LV., Harney T. and Huner NPA. (2000). Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. *Physiol. Pl.* **108**, 270-278.

Scheibe R. (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Pl.* **120**, 21-26.

Schmitz-Eiberger M. and Noga, G. (2001) Reduction of paraquat-induced oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* and *Malus domestica* leaves by α -tocopherol. *Scientia Horticulturae.* **91**, 153-167.

Schürman P. and Jacquot J-P (2000) Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 371-400.

Seeman J.R., Sharkey T.D., Wang J. and Osmond C.B. (1987) Environmental effects on photosynthesis, nitrogen use efficiency and metabolites pools in leaves of sun and shade plants. *Plant Physiol.* **84**: 796-802.

Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y. and Shinozaki K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**: 61-72.

Sen Gupta A., Heinen J.L., Holaday A.S., Burke J.J. and Allen R.D. (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 1629-1633.

Shang W. and Feierabend J. (1998). Slow turnover of the D1 reaction center protein of photosystem II in leaves of high mountain plants. *FEBS Lett.* **425**, 97–100.

Sharkey T.D. and Singasaas E.L. (1995) Why plants emit isoprene. *Nature* **374**: 769.

Sharkey T.D., Chen X. and Yeh S. (2001) Isoprene Increases Thermotolerance of Fosmidomycin-Fed Leaves. *Plant Physiol.* **125**, 2001-2006.

Siedow J.N. and Day D.A. (2000) Respiration and photorespiration. In *B Buchanan, W Gruissem, R Jones, eds, Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.*

Simons B.H., Millenaar F.F., Mulder L., Loon L.C.V. and Lambers H. (1999) Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of *Arabidopsis* with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant Physiol.* **120**, 529–538.

Stitt M. (1986) Limitation of Photosynthesis by Carbon Metabolism : I. Evidence for Excess Electron Transport Capacity in Leaves Carrying Out Photosynthesis in Saturating Light and CO₂ *Plant Physiol.* **81**: 1115-1122.

Streb P., Josse E-M, Gallouët E., Baptist F., Kuntz M. and Cornic G. (2005) Evidence for alternative electron sinks to photosynthetic carbon assimilation in the high mountain plant species *Ranunculus glacialis*. *Plant Cell. Environ.* **28** (9), 1123-1135.

Streb P., Michael-Knauf A. and Feierabend, J. (1993) Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. *Physiol. Pl.* **88**, 590-598.

Sunderhaus S, Dudkina N, Jansch L., Klodman J., Heinemeyer J., Perales M., Zabaleta E., Boekema E. and Braun H.P. (2006) Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of the mitochondrial complex I in plants. *J. Biol. Chem.* **281**(10): 6482-6488.

Syvertsen J.P., Lloyd J., McConchie C., Kriedemann P.E. and Farquhar G.D. (1995) On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant Cell Environ.*, **18**, 149–157.

Taiz L. and Zeiger E. (2002) *Plant Physiology*. 3rd ed. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, 427 p.

Taylor N.L., Day D.A. and Millar A.H. (2002) Environmental Stress Causes Oxidative Damage to Plant Mitochondria Leading to Inhibition of Glycine Decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 42663-42668.

Tcherkez G., Cornic G., Bligny R., Gout E. and Ghashghaie J. (2005) In vivo respiratory metabolism of illuminated leaves. *Plant Physiol.* **138**(3), 1596-1606.

Terashima I., Hanba Y.T., Tazoe Y., Vyas P. and Yano S. (2006) Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *J. Exp. Bot.*, **57**: 343-354.

Terashima I. and Ono K. (2002) Effects of HgCl₂ on CO₂ Dependence of Leaf Photosynthesis: Evidence Indicating Involvement of Aquaporins in CO₂ Diffusion across the Plasma Membrane. *Plant Cell Physiol.*, **43**: 70-78.

Tovar-Mendez A., Miernyk J.A. and Randall D.D. (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *Eur. J. Biochem.*, **270**: 1043–1049.

Trevanion S.J., Furbank R.T. and Ashton A.R. (1997) NADP-malate dehydrogenase in the C-4 plant *Flaveria bidentis*: cosense suppression of activity in mesophyll and bundle sheath cells and consequences for photosynthesis. *Plant Physiol.* **113**: 1153-1165.

Troughton J.H. (1971) Aspects of the evolution of the photosynthetic carboxylation reaction in plants. In *Photosynthesis and photorespiration*, pp 124-129, Ed Hatch M D, Osmond C B, Slatyer R O, Wiley Interscience, Sydney.

Tyerman S.D., Bohnert H.J., Maurel C., Steudle E. and Smith J.A.C. (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J. Exp. Bot.*, **50**: 1055 - 1071.

Tyerman S.D., Niemietz C.M. and Bramley H. (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell. Environ.* **25**, 173–194.

Uehlein N., Lovisolo C., Siefritz F. and Kaldenhoff R. (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*: **425**, 734-737.

Umbach A.L. and Siedow J.N. (1993) Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.*, **103**: 845–854.

Van Camp W., Willekens H., Bowler C., Van Montagu M., Inze D., Langebartels C. and Sandermann H. (1994) Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Biotechnology* **12**: 165-168.

Vedel F., Lalanne E., Sabar M., Chétrit P. and De Paepe R. (1994) The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: Composition, structure and mutational studies. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**, 629-643.

Vidal G. Ribas-Carbo M., Garmier M., Dubertret G., Rasmusson A.G., Foyer C.H. and De Paepe R. (2006) Impaired engagement of the alternative oxidase in the *Nicotiana sylvestris* Complex I-deficient CMSII mutant has implications for the orchestration of the harpin-induced hypersensitive response. *Plant Cell* (submitted).

von Caemmerer S. and Farquhar G.D. (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**: 376–387.

von Caemmerer S. and Evans J.R. (1991) Determination of the average partial pressure of CO₂ in chloroplasts from leaves of several C₃ plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**, 287-305.

von Caemmerer S., Evans J.R., Hudson G.S. and Andrews T.J. (1994) The kinetics of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in vivo inferred from measurements of photosynthesis in leaves of transgenic tobacco. *Planta* **195**, 88–97.

von Caemmerer S. (2000) Biochemical Models of Leaf Photosynthesis, Techniques in Plant Sciences No. 2. *CSIRO Publishing*, Collingwood, Victoria, Australia.

Vranova E., Inze D. and Van Breusegem F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **53**: 1227-1236.

Wagner A. M., and Moore A. L. (1997). Structure and function of the plant alternative oxidase : its putative role in the oxygen defence mechanism. *Bioscience Reports*, **17**(3).

Walters R.G., Rogers J.J.M., Shephard F. and Horton P. (1999) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the role of photoreceptors. *Planta* **209**, 517–527.

Walters RG, Shephard F, Rogers JJM, Rolfe SA, Horton P. (2003) Identification of mutants of *Arabidopsis* defective in acclimation of photosynthesis to the light environment. *Plant Physiol.* **131**, 472–481.

Walters R.G. (2005). Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J. Exp. Bot.* **56**, 435-447.

Wei Z., Laby R.J., Zumoff C.H., Bauer D.W., He S.Y., Collmer A. and Beer S.V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by *Erwinia amylovora*. *Science* **257**: 85-88.

Wild A., Höpfner M., Rühle W. and Richter M. (1986) Changes in the stoichiometry of photosystem II components as an adaptive response to high-light and low-light conditions during growth. *Z. Naturforsch.* **41**: 597-603.

Willekens H., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D., Langebartels C. and Sandermann H. (1994) Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiol.* **106**: 1007-1014.

Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO J.* **16**, 4806-4816.

Wise R.R. (1995) Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynt. Res.* **45**, 79-97.

Wollman F.A. (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* **20**: 3623–3630.

Wolosiuk R.A., Ballicora M.A. and Hagelin K. (1993) The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: enzyme modulation. *FASEB J.*, **7**: 622–637.

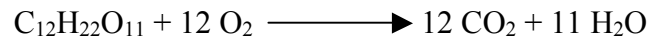
Xie Z. and Chen Z. (1999). Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiol.* **120**: 217-226.

Zhang N. and Portis Jr A.R. (1999) Mechanism of Light Regulation of Rubisco: a Unique Role for the Larger Rubisco Activase Isoform Involving Reductive Activation by Thioredoxin-F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 9438-9443.

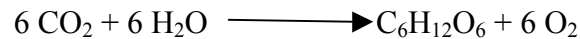
(1) Liste des équations

Généralités

(1) Equation simplifiée de la respiration



(2) Equation simplifiée de la photosynthèse



Modélisation de la photosynthèse chez les plantes C3

(3) Cinétiques de type michaélienne des vitesses de carboxylation (V_c) et d'oxygénation (V_o) de la Rubisco : $V_{c \max}$ et $V_{o \max}$ représentent respectivement les vitesses maximales de carboxylation et d'oxygénation de la Rubisco ; C et O les concentrations en CO_2 et O_2 au niveau des sites catalytiques de la Rubisco; K_c et K_o les constantes de vitesse de carboxylation et d'oxygénation du ribulose-1,5-bisphosphate par la Rubisco.

$$V_c = (V_{c \max} \cdot C / K_c) / (1 + C / K_c + O / K_o)$$
$$\text{et } V_o = (V_{o \max} \cdot O / K_o) / (1 + O / K_o + C / K_c)$$

(4) Assimilation nette de CO_2 en fonction de la respiration à la lumière et des vitesses de carboxylation et d'oxygénation de la Rubisco

$$A_n = V_c - 0,5 V_o - R_d$$

(5) Rapport des vitesses de carboxylation et d'oxygénation de la Rubisco en fonction du facteur de spécificité de l'enzyme et du rapport des concentrations en CO_2 et O_2 .

$$V_c / V_o = S_{c/o} \cdot C / O$$

(6) Détermination du facteur de spécificité de la rubisco à partir des constantes de Michaelis-Menten et les vitesses maximales de carboxylation et d'oxygénation de l'enzyme (K_c et K_o et $V_{c \max}$ et $V_{o \max}$)

$$S_{c/o} = V_{c \max} \cdot K_o / V_{o \max} \cdot K_c$$

(7) Expression de l'assimilation nette de CO_2 en fonction du facteur de spécificité de la rubisco en combinant les équations (3) et (4)

$$A_n = V_c \cdot (1 - 0,5 / S_{c/o} \cdot O / C) - R_d$$

(8) Concentration en CO_2 dans les chloroplastes en absence de respiration autre que la photorespiration, et pour une assimilation nette de CO_2 nulle. Dans ces conditions, le rapport des vitesses maximales de carboxylation et d'oxygénation de la rubisco est égal à 2

$$\Gamma^* = 0,5 \cdot O / S_{c/o}$$

(9) Expression de l'assimilation nette de CO_2 obtenue en combinant les équations (6) et (7)

$$A_n = (1 - \Gamma^* / C) \cdot V_c - R_d$$

Discrimination isotopique

(10) Composition isotopique du carbone

$$\delta^{13}\text{C} \text{ (en ‰)} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \cdot 1000 ; \text{ avec } R = {}^{13}\text{CO}_2 / {}^{12}\text{CO}_2$$

(11) Relation linéaire entre la discrimination isotopique du carbone (Δ) et le rapport entre les pressions partielles de CO_2 intercellulaires (c_i) et atmosphérique (c_a). a (4,4 ‰) représente la discrimination due à la diffusion de l'air jusqu'à l'intérieur de la feuille et b (29 ‰) la discrimination due à la carboxylation enzymatique (Rubisco).

$$\Delta_{(i)} = a + (b - a) \cdot c_i / c_a$$

Limitation stomatique

(12) Estimation de la limitation imposée sur l'assimilation de CO_2 par les stomates. A_o représente l'assimilation nette de CO_2 en conditions lumière-saturante sous CO_2 ambiant (ou sous lequel la plante a été cultivée si différent; ici $c_a = 380$ ppm) et A_{max} , l'assimilation nette de CO_2 toujours en condition de lumière saturante mais en absence de limitations dues à la couche limite et aux stomates.

$$L_s = 1 - (A_o / A_{max})$$

Fluorescence chlorophyllienne

(13) Rendement quantique maximum des centres réactionnels du PS II

$$F_v / F_m = (F_m - F_o) / F_m$$

(14) Rendement quantique dit opérationnel des centres réactionnels des PS II

$$F'_v / F'_m = (F'_m - F'_o) / F'_m$$

(15) Rendement quantique de la photochimie au niveau des PS II

$$\phi_{PSII} = (F'_m - F_s) / F'_m$$

(16) Rendement quantique de l'assimilation nette de CO_2 . I désigne la répartition de l'énergie incidente entre les PS I et PS II (classiquement égal à 0,5 chez les plantes C3) et α désigne le coefficient d'absorption des feuilles (environ 0,85 mais qui sera recalculé au cours de ce travail pour les plantes étudiées).

$$\phi_{CO_2} = (A_n - R_d) / (I \cdot \alpha)$$

(17) Quenching photochimique: part de l'énergie lumineuse absorbée dissipée en direction de la photochimie

$$qP = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_o)$$

(18) Quenching non photochimique

$$qN = (F_m - F'_m) / (F_m - F'_o)$$

(19) Quenching non photochimique

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$$

(20) Flux linéaire total d'électrons au travers du PS II. PFD représente la densité de flux quantique incidente.

$$ETR = \phi_{PSII} \cdot PFD \cdot (I \cdot \alpha)$$

Théorie utilisée pour la détermination de la conductance du mésophylle par spectroscopie de masse isotopique

(21) La discrimination globale durant la photosynthèse estimée en tenant compte de trois étapes discriminantes: passages successifs de la couche limite (a_b), des stomates (a) et à la dissolution et la diffusion du CO_2 en phase liquide (a_i)

$$\Delta_{obs} = a_b \cdot (c_a - c_s) / c_a + a \cdot (c_s - c_i) / c_a + a_i \cdot (c_i - c_c) / c_a + b \cdot c_c / c_a - d$$

(22) En négligeant l'effet de la couche limite et en combinant les équations (10) et (27),

$$-\Delta_{obs} + \Delta_i = a_i \cdot (-c_i + c_c) / c_a + b \cdot (-c_c + c_i) / c_a - d$$

(23) Sachant ensuite que $A_n = g_s (c_a - c_i) = g_m (c_i - c_c)$, g_s et g_m représentant les conductances stomatiques et interne à la diffusion du CO_2 , l'équation (28) devient:

$$\Delta_i - \Delta_{obs} = (b - a_i) / g_m \cdot A_n / c_a + d$$

(24) Comme l'assimilation, la discrimination isotopique photosynthétique est mesurée par comparaison de la composition de l'air entrant (c_e et δ_e) avec celle de l'air sortant de la chambre d'assimilation (c_o . δ_o) prenant ainsi en compte ce que la feuille a assimilé (δ_{abs}). On peut alors écrire:

$$c_e \cdot \delta_e = c_o \cdot \delta_o + (c_e - c_o) \cdot \delta_{abs}$$

(25) Définition expérimentale de la discrimination isotopique

$$\Delta_{obs} = (\delta_{source} - \delta_{produit}) / (\delta_{produit} + 1) \text{ soit } \Delta_{obs} = (\delta_o - \delta_{abs}) / (\delta_{abs} + 1)$$

(26) En remplaçant δ_{abs} dans l'équation (32) à partir de l'équation (31), on obtient:

$$\Delta_{obs} = \xi(\delta_o - \delta_e) / 1 + \delta_o - \xi(\delta_o - \delta_e) \quad \text{où } \xi = c_e / (c_e - c_o)$$

Calculs à partir des mesures des échanges gazeux foliaires et de la fluorescence chlorophyllienne

(27) Correction apportée à c^* à partir des valeurs de R_d et de conductance interne g_m selon (von Caemmerer, 2000)

$$\Gamma^* = c^* + R_d / g_m$$

(28) Facteur de spécificité apparent calculé à partir des valeurs de Γ^*

$$S_{app\ cc} = O/2\Gamma^*$$

(29) Rapport des vitesses de carboxylation et d'oxygénation de la rubisco en fonction du facteur de spécificité apparent de l'enzyme et du rapport des concentrations chloroplastiques en CO_2 et O_2

$$V_c / V_o = S_{app\ cc} \cdot c_c / O$$

(30) Flux d'électrons total (J_t) dirigé soit vers les réactions de carboxylation (J_c) soit vers les réactions d'oxygénation (J_o) de la rubisco, assumant que la photorespiration et l'assimilation de CO_2 sont les deux seules réactions en compétition pour les électrons de la chaîne chloroplastique.

$$J_t = [J_c + J_o]$$

(31) Flux d'électrons dirigé vers les réactions de carboxylation de la rubisco calculé en assumant que quatre électrons sont nécessaires pour un cycle de carboxylation et d'oxygénation, et qu'une molécule de CO_2 est dégagée tous les deux cycles d'oxygénation par la décarboxylation de la glycine au cours de la photorespiration

$$J_c = [4A_n + 0,5J_o + 4R_d]$$

(32) Flux d'électrons dirigé vers les réactions de carboxylation de la rubisco calculé en combinant les équations (23) et (24) à partir du flux total d'électrons (J_t), de l'assimilation nette de CO_2 et de la respiration à la lumière R_d

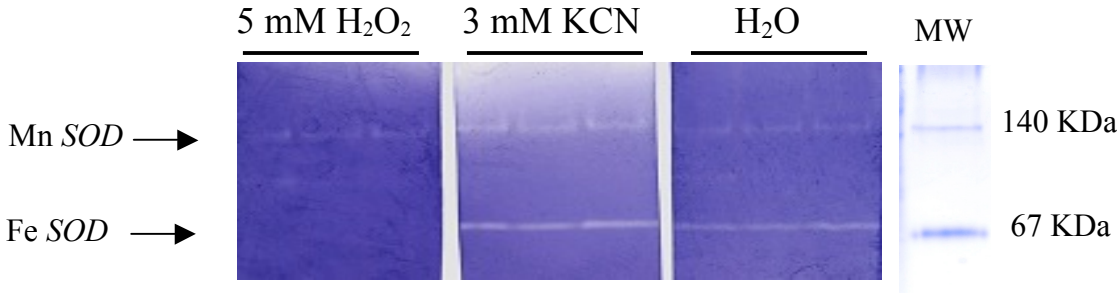
$$J_c = \frac{1}{3}[J_t + 8(A_n + R_d)]$$

(33) Flux d'électrons dirigé vers les réactions d'oxygénation de la rubisco calculé en combinant les équations (23) et (24) à partir du flux total d'électrons (J_t), de l'assimilation nette de CO_2 et de la respiration à la lumière R_d

$$J_o = \frac{2}{3}[J_t - 4(A_n + R_d)]$$

(2) Mise en évidence des isoformes SOD sur gel

Cette identification a été réalisée suivant une approche pharmaceutique sur gel natif en gradient d'acrylamide 6-12%. MW: marqueur de poids moléculaire.



(3) Profils RMN et HPLC des sucres solubles et sucres-phosphates chez les plantes WT et CMSII de *Nicotiana sylvestris* cultivées sous 80 et 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En collaboration avec le Pr Richard Bligny du laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale à Grenoble (RMN) et Mr Max Hill du laboratoire ESE (HPLC).

Annexe 3. Contenu constitutif en sucres solubles et intermédiaires hexoses-phosphate déterminé par RMN et HPLC de plantes WT et CMSII de *Nicotiana sylvestris* cultivées sous deux intensités lumineuses incidentes.

A : HPLC. Détermination de la concentration en saccharose (en mg/20 mg de matière sèche) sur des disques foliaires après 1 h de photopériode de plantes WT et CMSII cultivées sous 80 et 350 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

B : RMN

A

	WT 80	CMS 80	WT 350	CMS 350
Saccharose	0,09 \pm 0,008	0,12 \pm 0,01	0,09 \pm 0,002	0,10 \pm 0,008

B

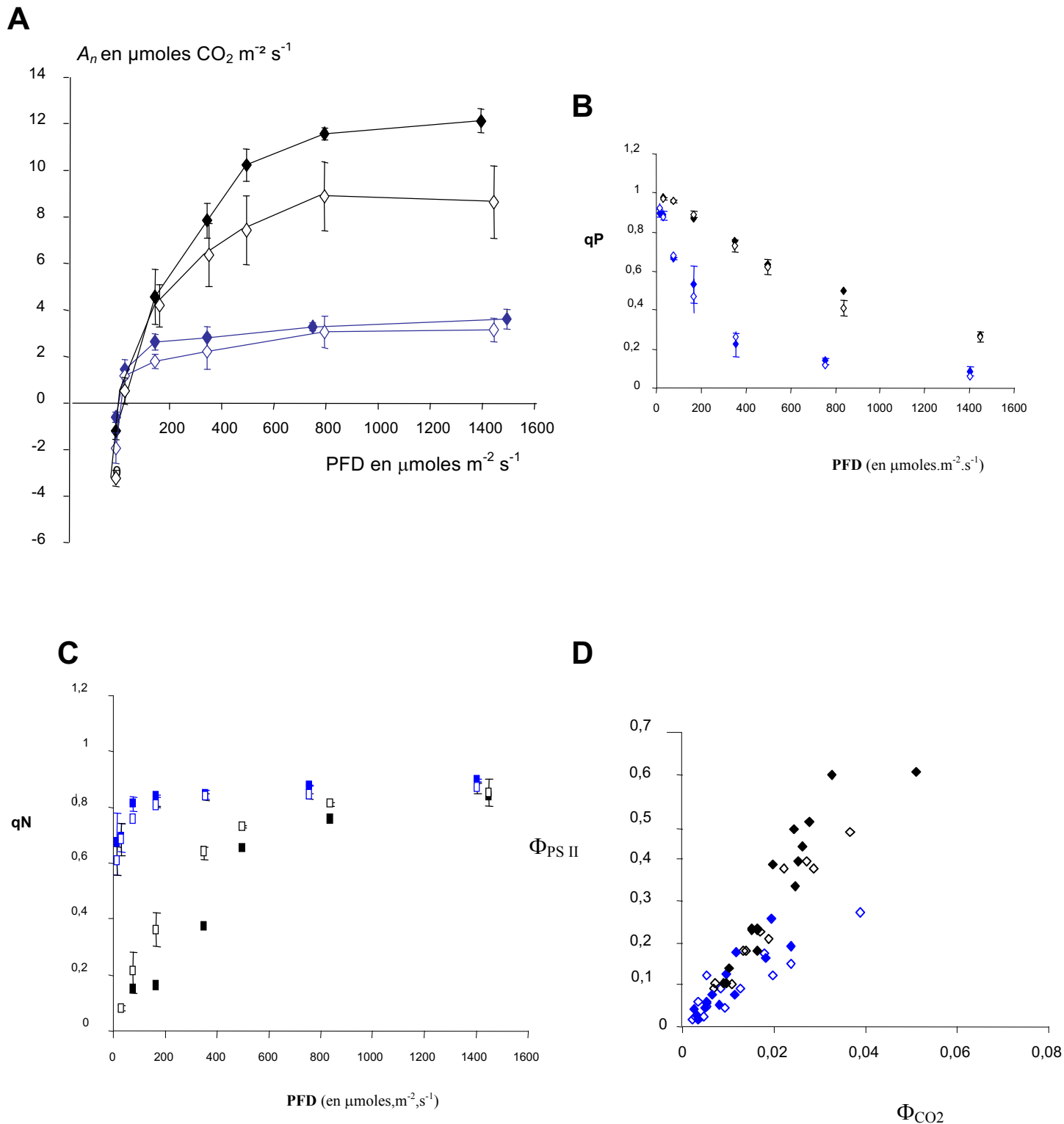
	WT 80	CMS 80	WT 350	CMS 350
F6P	0,176 \pm 0,003	0,138 \pm 0,032	0,145 \pm 0,006	0,132 \pm 0,039
G6P	1,0566 \pm 0,328	1,431 \pm 0,022	0,837 \pm 0,042	1,003 \pm 0,352
Man6P	0,224 \pm 0,005	0,426 \pm 0,008	0,287 \pm 0,029	0,242 \pm 0,057
HEXOSES-P	1,455 \pm0,366	1,995 \pm0,046	1,268 \pm0,021	1,374 \pm0,348

(4) Courbes de réponse de l'assimilation nette et de la fluorescence chlorophyllienne au froid et à la lumière incidente.

Résultats tirés et complétés de mon stage de DEA (Priault, 2002).

Annexe 4. Effets du froid sur l'assimilation de CO₂ et différents paramètres de la fluorescence chlorophyllienne.

Courbes de réponse de l'assimilation nette de CO₂ (**A**: A_n), du quenching photochimique (**B**: qP), du quenching non photochimique (**C**: qN) et **D**, des rendements quantiques de l'assimilation nette (Φ_{CO_2}) et du photosystème II (Φ_{PSII}) à des intensités lumineuses incidentes croissantes et pour deux températures (5°C et 23°C +/- 1°C) chez le type sauvage (WT $\blacklozenge/\blacklozenge$) et mutant (CMS \diamond/\diamond) de *Nicotiana sylvestris* cultivées sous 150 $\mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Le dispositif expérimental utilisé est celui décrit **figure 19B**.



Article 1

Priault P., Fresneau C., Noctor G., DePaepe R., Cornic G. and Streb P. (2006) The mitochondrial CMSII mutation of *Nicotiana sylvestris* impairs adjustment of photosynthetic carbon assimilation to higher growth irradiance. *Journal of Experimental Botany* **57**(9): 2075-2085.

Article 2

Priault P., Tcherkez G., Cornic G., De Paepe R., Naik R., Ghashghaie J. and Streb P. (2006) The lack of a functional mitochondrial complex I in a CMSII mutant of *Nicotiana sylvestris* increases photorespiration through an increased internal resistance to CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany* **57**(12): 3195-3207.

Article 3

Priault P., Vidal G., De Paepe R. and Ribas-Carbo M. (2006) Leaf age related changes in respiratory pathways are dependent on Complex I activity in *Nicotiana sylvestris*. *Physiologia Plantarum* (*in press*).

En collaboration avec le laboratoire 'Mitochondrie et Métabolisme' de l'Institut de Biotechnologie des Plantes de l'Université Paris-Sud-Orsay (R. De Paepe, G. Vidal) et l'Université des Iles Baléares (M. Ribas-Carbo, Palma de Majorca, Espagne).

Projet Article 4

Étude de la coopération inter-organelles dans l'établissement de la réponse hypersensible (HR).

En collaboration avec le laboratoire 'Mitochondrie et Métabolisme' de l'Institut de Biotechnologie des Plantes de l'Université Paris-Sud-Orsay (R. De Paepe, G. Vidal et M. Garmier).

Définitions

La réponse hypersensible (RH) est déclenchée par la reconnaissance spécifique (hôte: réaction gène Avr/gène de résistance, ou RH-like: réaction non hôte) d'un pathogène et a pour résultat de stopper la progression de ce pathogène. Elle semble associée à l'établissement d'une réaction de type « immunitaire », rendant la plante résistante non spécifiquement à une infection ultérieure (résistance systémique acquise ou SAR). La RH se caractérise par la mort des cellules au niveau du site d'infection en parallèle avec l'activation d'une batterie de réactions de défense: un épaissement de la paroi cellulaire (lignification, dépôt de callose), une stimulation des voies métaboliques secondaires (synthèse de phytoalexines, d'acide salicylique, d'acide jasmonique), et/ou la production de protéines de défense (protéines PR, peptides antimicrobiens défensives, thionines) (Dangl et al., 1996). Ces défenses sont mises en place suite au déclenchement rapide de cascades de signalisation faisant intervenir des flux d'ions (K^+ , H^+), des événements de phosphorylations/déphosphorylations, des flux calciques, une production de FAO ainsi qu'une régulation des systèmes antioxydants. Ces réponses conduisent à la formation d'une lésion composée de cellules mortes, clairement délimitée par du tissu sain ainsi qu'à la transduction de signaux intercellulaires et systémiques.

La mort des cellules végétales n'est donc pas directement causée par le pathogène mais est la conséquence de mécanismes complexes mis en place par la plante, on parle de 'mort cellulaire programmée' (ou Programmed Cell Death, PCD). La PCD n'existe pas seulement lors de la RH, elle est nécessaire au développement et à la survie des plantes: elle intervient dans la différenciation des tissus du xylème, la formation de lobes foliaires chez certaines espèces et dans les processus de sénescence (pour revue : Pennell et Lamb, 1997). Dans un certain nombre de cas, la PCD des plantes est très similaire à une forme particulière de mort programmée décrite chez les cellules animales, appelée 'Apoptose'. Celle-ci est caractérisée par des changements morphologiques, comme la condensation du cytoplasme et du noyau, la déstructuration des membranes, mais aussi biochimiques et moléculaires comme l'influx de calcium, l'activation de protéases (cystéines protéases ou caspases) et de nucléases entraînant une fragmentation de l'ADN nucléaire (Ryerson et Health, 1996). Les travaux sur la PCD animale ont mis en évidence l'importance de la mitochondrie au niveau de l'intégration et de l'amplification des signaux de stress émanant de différents compartiments sub-cellulaires : par exemple la translocation vers la mitochondrie de signaux protéiques émanant du réticulum

endoplasmique (BCL-2, BAX), de la membrane plasmique (caspase-8) ou du cytosol (BAX, BAD, BID). Des études *in vitro* ont montré que ces protéines s'associaient avec la membrane mitochondriale externe, rendant la membrane interne mitochondriale perméable aux composés de bas poids moléculaires, phénomène dit de Transition de Perméabilité Mitochondriale (TPM). La TPM est un événement clef du déclenchement de l'exécution de la PCD, suite au relargage de protéines mitochondriales telles le cytochrome C, induisant l'activation de la cascade de régulation des caspases, et l'AIF (apoptosis inducing factor) activant les nucléases (Pedersen, 1999).

Bien qu'aucun gène homologue de la famille BCL2 ou caspase n'ait été caractérisé à ce jour chez les végétaux, certains résultats suggèrent que la mitochondrie végétale puisse jouer un rôle similaire à la mitochondrie animale dans la mort cellulaire (Lam et al., 2001). D'autre part, la PCD végétale, comme son homologue animale, est régulée par des changements de niveaux de messagers cellulaires comme le calcium et les FAO (état redox), des modifications du pH ou du taux de métabolites reflétant le statut énergétique cellulaire (ATP, ADP, NADH, NADPH). La mitochondrie semble donc pouvoir intégrer de nombreux signaux reflétant l'homéostasie ionique et métabolique de la cellule. Cependant, ces effets n'ont pas été observés dans les mêmes systèmes (Levine et al., 1996 ; Ryerson et Health, 1996), et les cascades de signalisation menant à la mort ainsi que ses caractéristiques peuvent varier en fonction des types cellulaires, des stimuli, des conditions environnementales et de l'état physiologique de la plante.

Le système éliciteur

Les harpines sont des protéines élicitrices d'origine bactérienne, capables d'induire des réponses de défense et la mort cellulaire sur plantes non-hôtes (= RH-like). Elles ont été isolées chez les bactéries phytopathogènes *Erwinia amylovora* (HrpN_{Ea}, 44kDa; Wei et al., 1992) et *Erwinia chrysantemi* (HrpN_{Ec}; Wei et al. 1992), *Pseudomonas syringae pv syringae* (HrpZ_{Pss} 45kDa; He et al., 1993), *pv tomato*, *glycinea* ou *phaseolicola* (HrpZ_{PspH}; Preston et al., 1995) et *Ralstonia soloacearum* (appelée *PopA*, 38kDa; Arlat et al., 1994). Ces protéines sont hydrophiles, riches en glycine et thermostables.

Les gènes codant les harpines font partie du locus *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity). Le locus *hrp* code pour des protéines essentielles au pouvoir pathogène des

bactéries sur plantes-hôtes mais aussi à leur capacité à induire une RH-like sur plante non-hôte (comme le tabac (Wei et al., 1992) et *Arabidopsis*) ou sur cultivar résistants de plantes-hôtes (pour revue Galan et Collmer 1999).

Sur les tissus foliaires de *Nicotiana tabacum* elle induit un influx de calcium dans le cytosol (He et al., 1994) et l'expression d'une protéine kinase (Adam et al 1997). Sur cultures cellulaires, elle induit chez *Arabidopsis* des réponses précoces comme un efflux de potassium (El-Maarouf et al., 2001), et chez *N. tabacum*, une inhibition rapide de la synthèse d'ATP (Xie et Chen 2000) et une inhibition de la pompe à protons (H^+ -ATPase), entraînant une dépolarisation de la membrane plasmique ainsi qu'une alcalinisation du milieu extracellulaire (Popham et al., 1995; Pike et al., 1998) et la production de FAO (Baker et al., 1993).

Ainsi, bien qu'elle ne soit pas l'unique facteur responsable de la RH (Barney, 1995), et que son mode de perception par la plante soit mal connu, la harpine est une des seules protéines bactériennes élicitrices de la RH sur plantes non-hôtes. C'est pourquoi, associée à un système de sur-expression dans la bactérie *Escherichia coli*, elle constitue un outil puissant pour étudier les événements survenant au cours de la réponse hypersensible.

Objectifs de l'étude

Nous avons examiné l'implication possible d'un dialogue mitochondries/chloroplastes dans la mise en place et le déroulement de la réponse hypersensible induite par la harpine chez *Nicotiana sylvestris*. Pour cela, quatre conditions expérimentales ont été définies: l'obscurité et une intensité lumineuse de $350 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR associée chacune à une concentration incidente en O_2 soit atmosphérique (21%), soit très faible (<0,1%). La concentration en CO_2 et la température sont maintenues tout au long des expériences à des valeurs de 380 ppm et 23 °C respectivement. Des expériences "contrôles" sont réalisées via l'infiltration d'un tampon au lieu de la harpine, mais également par le suivi de plantes non infiltrées sont réalisées.

Cette étude fera l'objet d'un article scientifique, dont le résumé est présenté ci-contre. Ma contribution à ce travail a consisté en un suivi du développement des symptômes liés à l'induction de la HR (déshydratation et conductivité) et en la réalisation des mesures des échanges gazeux et de fluorescence chlorophyllienne à l'aide du Licor 6400-40 pour l'ensemble des conditions expérimentales étudiées. Ces résultats sont présentés ci-contre.

Principaux résultats et conclusions

Le processus de RH a lieu dans l'ensemble des conditions que nous avons testées, à savoir sous une lumière incidente de $350 \mu\text{moles PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, à l'obscurité et sous atmosphère appauvrie ou non en O_2 . La mort apparaît plus précoce d'une part sous atmosphère déplétée en O_2 ($< 0,1\%$) comparativement à une atmosphère contenant 21% d' O_2 et d'autre part à la lumière qu'à l'obscurité. Trois résultats majeurs ressortent de ce travail: (i) le rôle des FAO dans la signalisation de la réponse hypersensible induite par la harpigne chez *Nicotiana sylvestris* semble ici remis en question, (ii) l'activité photosynthétique favoriserait le processus de mort cellulaire tandis que (iii) l'activité respiratoire le contrebalancerait :

- (i) Le processus de RH est en effet accéléré à la lumière sous atmosphère très appauvrie en O_2 , et se met en place également dans des conditions associant l'obscurité à une atmosphère très appauvrie en O_2 , conditions non favorables à la production de FAO dans les cellules.
- (ii) Le fonctionnement chloroplastique pourrait jouer un rôle dans la signalisation de la HR. En effet, l'état rédox du chloroplaste et les FAO dont il est la principale source dans les cellules végétales, peut réguler l'expression de gènes nucléaires (Pfanschmidt, 2003 ; Baier et Dietz, 2005) tels que le gène codant pour l'Ascorbate Peroxydase cytosolique, APXc (chez *Arabidopsis* : Karpinski et al., 1997 ; Chang et al., 2004). Dans notre système d'étude, la plus faible assimilation nette de CO_2 et l'excès d'électrons le long de la chaîne photosynthétique de transport des électrons chez le mutant CMSII de *Nicotiana sylvestris* décrits au cours de ce travail de thèse pourrait impliquer une production plus importante d' H_2O_2 chez ces plantes, comparativement aux plantes WT, et ainsi induire l'expression d'un ou de plusieurs gènes, dont l'APXc (Garmier et al., 2003). La photosynthèse, ou plus généralement le fonctionnement des chloroplastes pourraient également être impliqués dans une accélération de la HR chez *Nicotiana sylvestris*. L'existence de mutants de propagation de mort cellulaire chez *Arabidopsis* apporte aussi des éléments en faveur d'un rôle des FAO chloroplastiques dans l'amplification et/ou l'exécution de la HR (exemple du mutant lsd1 : Mateo et al., 2004). Chez ces plantes, les phénotypes de lésions

$$\frac{1_n - (1 - \dots) / C}{R_d} \cdot V_c$$

inductibles à la lumière semblent causés par une production excessive de FAO non pris en charge par les systèmes de détoxification ;

- (iii) A l'obscurité, l'induction de la mort cellulaire induite par la cryptogéine est indépendante du H₂O₂ (Montillet et al., 2005) et le fonctionnement mitochondrial, principal fournisseur en ATP cellulaire, pourrait participer aux réactions de défense de la cellule. De plus, les mécanismes de la HR à l'obscurité pourraient davantage impliquer le métabolisme de la lipoxygénase (9-LOX) que celui de l'H₂O₂ (Rusterucci et al., 1999 ; Montillet et al., 2005).