



**HAL**  
open science

**Etude de la biosynthese du nad chez les plantes :  
conséquences physiologiques de sa manipulation chez  
Arabidopsis thaliana**

Pierre Pétriacq

► **To cite this version:**

Pierre Pétriacq. Etude de la biosynthese du nad chez les plantes : conséquences physiologiques de sa manipulation chez Arabidopsis thaliana. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112188 . tel-00661699

**HAL Id: tel-00661699**

**<https://theses.hal.science/tel-00661699v1>**

Submitted on 20 Jan 2012

**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.



**Université Paris Sud 11 – UFR Sciences d’Orsay**

Année universitaire 2010 - 2011

## **Thèse**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE L’UNIVERSITE PARIS SUD 11**

Par

**Pierre Pétriacq**

# **ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE DU NAD CHEZ LES PLANTES : conséquences physiologiques de sa manipulation chez *Arabidopsis thaliana*.**

Soutenue le 7 octobre 2011, devant le jury d’examen :

**Françoise Corbineau**, Professeure, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Examinatrice

**Alia Dellagi**, Maître de Conférence, AgroParisTech, Examinatrice

**Bertrand Gakière**, Maître de Conférence, Université Paris Sud 11, Directeur de thèse

**Yves Gibon**, Directeur de Recherche, INRA de Bordeaux, Rapporteur

**Stéphane Ravanel**, Directeur de Recherche, CEA de Grenoble, Rapporteur

**Guillaume Tcherkez**, Professeur, Université Paris Sud 11, Président du jury

Thèse préparée au sein de l’Institut de Biologie des Plantes, Unité Mixte de Recherche CNRS/Université Paris Sud 11 (UMR8618)



## Résumé

Porteur redox intervenant dans nombre de processus métaboliques, le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) est central pour les cellules vivantes. Outre son importance dans le métabolisme oxydoréductif, des données récentes suggèrent fortement d'autres rôles importants pour le NAD dans la signalisation cellulaire. Un système inductible d'enrichissement en NAD en surproduisant la quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT) d'*Escherichia coli* chez *Arabidopsis thaliana* a permis de mettre en évidence l'implication du NAD dans les mécanismes spécifiques de défenses qui régissent les interactions plante-agent pathogène. Par ailleurs, une dérégulation de la synthèse de NAD sur l'étape enzymatique catalysée par la QPT endogène d'*Arabidopsis thaliana* souligne le rôle critique du NAD dans la balance C/N des plantes, en particulier en bouleversant l'assimilation de l'azote en conditions photorespiratoires. Ces travaux nous ouvrent à une nouvelle compréhension des mécanismes de signalisation impliquant le NAD dans les grandes fonctions métaboliques des plantes.

**Mots clé :** NAD, *Arabidopsis thaliana*, quinolinate phosphoribosyltransférase, signalisation, métabolisme azoté, interactions plante-pathogène

## Summary

Plant development and functions are underpinned by redox reactions which depend on cofactors such as pyridine nucleotides as nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). Beside its redox properties, NAD has recently been implicated in cellular signalling. An inducible system based on *Escherichia coli* quinolinate phosphoribosyltransferase (QPT) overproduction in transgenic *Arabidopsis thaliana* was set up as a convenient experimental technique to raise NAD content. This build-up highlights the involvement of NAD in plant-pathogen specific defense mechanisms. Furthermore, manipulating endogenous *Arabidopsis thaliana* QPT levels was used to deregulate NAD production. Such an approach points out the critical role of NAD in C/N interactions by shaking up nitrogen assimilation upon photorespiratory conditions. These results pave the way for a new understanding of signalling mechanisms involving NAD in plants major metabolic functions.

**Key words :** NAD, *Arabidopsis thaliana*, quinolinate phosphoribosyltransferase, signalling, nitrogen metabolism, plant-pathogen interactions





*"We are all in the gutter, but some of us are looking at the stars."*

*"Nothing that is worth knowing can be taught."*

Oscar Wilde

*"Il faut encore avoir du chaos en soi pour pouvoir enfanter une étoile qui danse."*

Friedrich Nietzsche, *Ainsi parlait Zarathoustra*

*"Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre."*

*"On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ; on ne voit que ce qui reste à faire."*

Marie Curie



*A la mémoire de mon père.*

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr. Michel Dron, ancien Directeur de l'École Doctorale *Science du Végétal* et actuellement Directeur du laboratoire, pour sa confiance dans mon projet de thèse et pour m'avoir ensuite permis d'effectuer mes travaux de recherche à l'Institut de Biologie des Plantes (IBP).

Je remercie chaleureusement le Dr. Bertrand Gakière qui m'a encadré pendant ces trois années de thèse, et avec qui j'ai partagé de nombreuses expériences enrichissantes, non seulement sur le plan scientifique, mais également sur le plan personnel. Bertrand, je ne saurais comment te remercier de ta confiance presque religieuse que tu m'as accordée pour le déroulement du projet de thèse, malgré, il faut l'avouer, quelques périodes de chaos et de bouleversement humains et diplomatiques. La transversalité du projet NAD m'a permis d'acquérir une large palette de techniques d'analyses, et là encore, tu m'as fait confiance dans l'acquisition et l'utilisation de ces outils méthodologiques. A tes côtés, j'ai stimulé mon émancipation professionnelle et personnelle, et tu as su me faire comprendre que rigueur et tolérance sont des valeurs précieuses pour la poursuite d'une carrière universitaire. Étant ton premier thésard, je crois que nous avons aussi beaucoup appris l'un de l'autre. Enfin, d'un point de vue plus personnel, merci pour ton altruisme et ton enthousiasme, ainsi que toutes ces blagues que souvent seuls nous deux comprenons.

J'exprime également ma sincère reconnaissance au Pr. Guillaume Tcherkez, et le remercie pour ses bons conseils et son aide précieuse en métabolisme végétal. Guillaume, en plus de ton inaltérable sympathie, tu t'es montré présent et efficace dans les moments difficiles pour le jeune thésard que j'étais. Je ne parle même pas de l'aide que tu as pu m'apporter par tes conseils souvent percutants et toujours d'une grande efficacité.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude et affection à Caroline Mauve et Laure Didierlaurent, mes amies et complices, qui ont su stimuler mes goûts pour la métabolomique, la chimie analytique, et la phytopathologie. Un grand merci également à Florence Guérard, Marlène Lamothe et Françoise Gilard pour leur aide technique sur la Plateforme Métabolisme-Métabolome. Je n'oublie pas de remercier Valérie Cantonny, pour son amitié et sa pugnacité à la course lors de nos repas de midi, même lorsque le temps nous était contraire. Je ne pouvais que réussir, entouré de femmes si merveilleuses.

Je remercie tout particulièrement Rosine de Paepe, Jean-Pierre Renou et Marie Garmier pour leurs conseils avisés. Merci aussi à tous les membres de l'équipe (Paul Gauthier, Jérémy Lothier, Édouard Boex-Fontvieille, Aline Mahé) que je peux assurer de mon amitié, ainsi que tous les collègues de l'IBP qui m'ont soutenu et qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. Merci aux stagiaires qui se sont impliqués dans le projet de thèse : Linda, Antoine, Aurélie et Abdelwahab. J'espère qu'à mes côtés, ils ont appris à aimer la recherche. Je leur souhaite de réussir.

Je tiens à remercier tous les membres du jury, Françoise Corbineau, Alia Dellagi, Bertrand Gakière, Yves Gibon, Stéphane Ravel et Guillaume Tcherkez pour avoir accepté de juger mes travaux, pour leurs messages de sympathie lors de la soutenance, et pour les remarques pertinentes qui ont permis d'améliorer ce manuscrit.

J'espérais en travaillant avec le Pr. Graham Noctor dans l'équipe duquel j'ai débuté, apprendre de son expérience. Mais très vite se sont créés des conflits incompréhensibles à mes yeux et un antagonisme certain, ce que je déplore profondément. J'ai ressenti de sa part un manque d'intégrité scientifique mais cela m'a appris que dans la recherche il fallait savoir gérer les conflits. Je n'aurai pas tout perdu à son contact.

Je profite de ces remerciements pour témoigner ma reconnaissance à mes amis (merci Clément pour la relecture du manuscrit) et ma famille qui ont su être présents dans les bons et les moins bons moments de mon doctorat. Une pensée particulière pour ma mère, ma tante Ludmila et mes oncles (Georges<sup>2</sup>, Nicolas et Jean-Jacques), pour leur soutien inconditionnel. Un immense merci à ma sœur Anne-Laure, son mari Thierry et la petite Emilia qui ont roulé toute la nuit en raison des grèves pour être les supporters du premier rang le jour de la soutenance. Je voudrais dédier cet ouvrage à la mémoire de mon père. De là où il est, je suis certain de sa fierté.

Enfin, je voulais remercier la personne qui m'a supporté tout au long de ces trois années, avec son lot de joies, de déceptions et de détresses. Jeannot, merci pour ton soutien de tous les instants. Et toi Mythryl, merci pour tes ronrons réconfortants !

## Abréviations

### Composés

**2-OG** 2-oxoglutarate  
**ADN** Acide désoxyribonucléique  
**ADNc** ADN complémentaire  
**ADP** Adénosine 5'-diphosphate  
**ADPR** Adénosine diphosphate ribose  
**AMP** Adénosine 5'-monophosphate  
**ARN** Acide ribonucléique  
**ATP** Adénosine 5'-triphosphate  
**BET** Bromure d'éthidium  
**BSA** Albumine sérique bovine  
**Ca<sup>2+</sup>** Ion calcium  
**cADPR** Adénosine diphosphate ribose cyclique  
**DCPIP** 2,6-dichlorophénol-indophénol  
**DHAP** Dihydroxyacétone phosphate  
**DTT** Dithiothréitol  
**EDTA** Acide éthylène diamine tétra-acétique  
**ET** Ethylène  
**FAD** Flavine adénine dinucléotide  
**Fd** Ferrédoxine  
**G-SA** Acide salicylique glycosylé  
**GSH** Glutathion réduit  
**GSSG** Glutathion oxydé  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peroxyde d'hydrogène  
**HEPES** Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
**HCl** Acide chlorhydrique  
**IA** Iminoaspartate  
**IPTG** Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside  
**JA** Acide jasmonique  
**MgCl<sub>2</sub>** Chlorure de magnésium  
**MeJA** Méthyle jasmonate  
**MeSA** Méthyle salicylate  
**MOPS** Acide 4(N-morpholino) propane sulfonique  
**NA** Nicotinate  
**NaAD** Acide nicotinique adénine dinucléotide  
**NaCl** Chlorure de sodium  
**NAD** Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup> et NADH)  
**NAD<sup>+</sup>** NAD, forme oxydée  
**NADH** NAD, forme réduite  
**NADP** NAD phosphate (NADP<sup>+</sup> et NADPH)  
**NADP<sup>+</sup>** NAD phosphate, forme oxydée  
**NADPH** NAD phosphate, forme réduite  
**NaMN** Acide nicotinique mononucléotide  
**NAR** Nicotinate riboside  
**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** Ion ammonium  
**NH<sub>4</sub>Cl** Chlorure d'ammonium  
**NAM** Nicotinamide  
**NO** Monoxyde d'azote  
**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** Ion nitrate  
**NMN** Nicotinamide mononucléotide  
**OAA** Oxaloacétate  
**P** Phosphate  
**PPi** Pyrophosphate inorganique

**PMS** Phénazyne méthosulfate  
**PMSF** Phénylméthanesulfonide fluoride  
**PRPP** 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate  
**QA/Q** Quinolinate  
**ROS** Formes actives de l'oxygène (*Radical oxygen species*)  
**RuBP** Ribulose 1,5-bisphosphate  
**SA** Acide salicylique  
**TFA** Acide trifluoroacétique  
**TRIS** Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

### Acides aminés

Les acides aminés protéiques sont désignés par leur nomenclature à trois lettres.

**α-ABA** Acide α-aminobutyrique  
**γ-ABA** Acide γ-aminobutyrique  
**γ-EC** γ-glutamyl-cystéine  
**Cys-Gly** Cystéine-glycine  
**hCys** Homocystéine  
**hSer** Homosérine  
**O-AcSer** O-acétylsérine  
**Orn** Ornithine  
**SAH** S-adenosyl homocystéine  
**SAM** S-adenosyl méthionine

### Enzymes

**AO** Aspartate Oxydase  
**ARTs** Adénosine diphosphate ribosyltransférase  
**AS** Asparagine synthétase  
**CPS** Carbamoylphosphate synthase  
**γ-ECS** γ-glutamyl-cystéine synthétase  
**GAPDH** Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
**GDC** Glycine décarboxylase  
**GDH** Glutamate déshydrogénase  
**GLIP1** lipase GLIP1  
**GOGAT** Glutamate synthase  
**GR** Glutathion réductase  
**GS** Glutamine synthétase  
**GSH-S** Glutathion synthétase  
**GST** Glutathion S-transférase  
**HAD** 3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase  
**ICS1** Isochorismate synthase 1  
**IDO** Indoléamine 2,3-dioxygénase  
**KFA** Kynurénine formamidase  
**KMO** Kynurénine 3-monoxygénase  
**KYN** Kynuréninase  
**N(a)MNAT** Nicotinamide (acide nicotinique) mononucléotide adényltransférase  
**NADS** NAD synthétase  
**NADK** NAD kinase  
**NAMPT** Nicotinamide phosphoribosyltransférase  
**NaPT** Acide nicotinique phosphoribosyltransférase  
**NIC** Nicotinamidase  
**NiR** Nitrite réductase

**NR** Nitrate réductase  
**PAL** Phénylalanine ammonia-lyase  
**PARPs** Poly(ADP-ribose) polymérase  
**Rubisco** Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase  
**QS** Quinolinate synthase  
**QPT** Quinolinate phosphoribosyltransférase  
**TDO** Tryptophane 2,3-dioxygénase  
**TIM** Triose phosphate isomérase  
**SIR/SRT** Sirtuine  
**SHMT** Sérine hydroxyméthyltransférase

#### Unité/Référence

**A** Assimilation nette du CO<sub>2</sub>  
**° C** Degré Celsius  
**cfu** Unité formant colonie  
**Ci** Curie  
**m** Mètre  
**M** Molaire  
**L** Litre  
**μ** Micro  
**n** Nano  
**Da** Dalton  
**DO** Densité Optique  
**ENH** Électrode normale à hydrogène  
**g** Unité de gravitation  
**g** Gramme  
**h** Heure  
**min** Minute  
**V** Volt  
**pb** Paire de bases  
**P/V** Poids/volume  
**s** Seconde  
**U** Unité  
**V/V** Volume/volume

#### Constantes

**AS** Activité spécifique  
**K<sub>cat</sub>** Constante catalytique  
**K<sub>i</sub>** Constante d'inhibition  
**K<sub>m</sub>** Constante de Michaëlis-Menten  
**V<sub>max</sub>** Vitesse maximale

#### Techniques

**% N** Pourcentage d'azote  
**δ<sup>15</sup>N** Composition isotopique de l'azote par référence au N<sub>2</sub> atmosphérique  
**EA-IRMS** Analyseur élémentaire couplé à la spectrométrie de masse à ratio isotopique  
**GCMS** Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse  
**HPLC** Chromatographie liquide haute performance  
**LCMS** Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse  
**LB** Luria Bertani  
**Milieu MS** Milieu de Murashige & Skoog

**PCR** *Polymerase Chain Reaction* (Réaction de Polymérisation en Chaîne)  
**RT-qPCR** PCR quantitative  
**TP** Tampon  
**UV** Ultra violet

#### Autres

**AMT** Transporteur d'ammonium  
**Avr** Avirulent  
**f. sp.** Forme spéciale  
**HR** Réponse hypersensible  
*i.e. In extenso*  
**LAR** Résistance locale acquise  
**NiTR** Transporteur de nitrites  
**NTR** Transporteur de nitrates  
**PR** *Pathogen related*  
**Pst** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*  
**pv.** Pathovar  
**SAR** Résistance systémique acquise



## Table des matières

---

Préambule .....	1
-----------------	---

### INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) .....</b>	<b>2</b>
A. <i>Structure de la molécule</i> .....	2
B. <i>Propriétés physico-chimiques</i> .....	3
C. <i>Localisation subcellulaire et concentration physiologique</i> .....	4
<b>II. Biosynthèse du NAD .....</b>	<b>6</b>
A. <i>Synthèse dite de novo</i> .....	7
1. Synthèse du quinolinate à partir du tryptophane .....	7
2. Synthèse du quinolinate à partir de l'aspartate .....	8
3. La quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT) .....	10
4. Synthèse du NAD à partir du NaMN .....	14
B. <i>Formation du NADP : les NAD kinases</i> .....	16
<b>III. Recyclage du NAD et de ses dérivés .....</b>	<b>18</b>
A. <i>Recyclage des nucléotides à pyridine</i> .....	19
1. Du NAD au nicotinate : le métabolisme du nicotinamide .....	19
B. <i>Recyclage des pyridines nucléosides</i> .....	23
<b>III. Transport des nucléotides à pyridine .....</b>	<b>24</b>
<b>IV. Catabolisme du NAD .....</b>	<b>26</b>
A. <i>Le NAD, précurseur de la synthèse de l'ADP-Ribose cyclique (cADPR)</i> .....	27
B. <i>Le NAD, substrat des polyADP-Ribose Polymérase (PARPs)</i> .....	27
C. <i>Le NAD, substrat des désacétylations catalysées par les sirtuines</i> .....	28
<b>V. Rôles du NAD dans le métabolisme rédox .....</b>	<b>29</b>
A. <i>Un rôle pour le NAD dans le métabolisme azoté</i> .....	29
1. L'azote, un macroélément indispensable aux végétaux .....	29
2. Transport du nitrate et de l'ammonium du sol .....	30
3. La Nitrate Réductase, <i>point d'entrée</i> du métabolisme azoté, nécessite le NAD(P)H .....	32
B. <i>Homéostasie du NAD et métabolisme primaire (C, N)</i> .....	33
1. Implication du NAD(P)H dans la réduction des nitrates .....	34
2. Le recyclage rédox mitochondrial, acteur clé de la ré-assimilation de l'azote .....	35
3. La modulation de la balance rédox influe fortement sur la coordination des métabolismes C et N .....	36
4. Implication de la biosynthèse du NAD dans le métabolisme C et N .....	37
C. <i>Oxydation du NADPH : cas des NADPH oxydases</i> .....	38
<b>VI. Autres rôles pour le NAD dans la signalisation cellulaire .....</b>	<b>40</b>
A. <i>Importance du NAD dans les processus développementaux</i> .....	40
1. Physiologie de la germination .....	40
2. Développement et sénescence .....	43

B.	<i>Rôles du NAD dans la physiologie des stress</i> .....	46
1.	Les réactions de défense des plantes .....	46
2.	Le NAD, molécule signal dans les réponses de défense des plantes .....	52
3.	NAD et rhizosphère .....	55
4.	NAD et tolérance aux stress abiotiques .....	55
<b>VII.</b>	<b>Objectifs du travail de thèse</b> .....	<b>59</b>
<b><u>MATERIELS ET METHODES</u></b>		
<b>I.</b>	<b>Matériels biologiques</b> .....	<b>60</b>
A.	<i>Matériel végétal</i> .....	60
1.	Plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	60
B.	<i>Conditions de culture des plantes</i> .....	61
1.	Cultures en pots .....	61
2.	Cultures hydroponiques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	62
3.	Cultures <i>in vitro</i> .....	63
C.	<i>Souches bactériennes</i> .....	64
1.	Agents pathogènes .....	64
2.	Autres souches bactériennes .....	65
D.	<i>Un système inductible d'augmentation des niveaux de NAD</i> .....	65
1.	Incubation de disques foliaires en présence de quinolinate .....	65
2.	Infiltration <i>in folia</i> du quinolinate .....	66
<b>IV.</b>	<b>Obtention des lignées transgéniques</b> .....	<b>66</b>
A.	<i>Transformation d'Arabidopsis thaliana par Agrobactéries</i> .....	66
B.	<i>Sélection des plantes transformées</i> .....	66
1.	Sélection sur kanamycine .....	66
2.	Sélection sur Basta® .....	67
<b>VIII.</b>	<b>Techniques d'études moléculaires</b> .....	<b>67</b>
A.	<i>Amorces oligonucléotidiques utilisées dans ce travail</i> .....	67
B.	<i>Criblage par PCR des insertions d'ADN-T dans les mutants d'Arabidopsis thaliana</i> .....	68
1.	Extraction d'ADN génomique à partir d'échantillon foliaire .....	68
2.	Amplification par PCR .....	68
3.	Electrophorèse en gel d'agarose .....	69
4.	Transformation d'Agrobactéries par électroporation .....	69
5.	Séquençage des fragments d'ADN .....	70
<b>IX.</b>	<b>Techniques d'études transcriptomiques</b> .....	<b>70</b>
A.	<i>Approche ciblée par mesure des niveaux de transcrits de gènes d'intérêt</i> .....	70
1.	Extraction et dosage d'ARN .....	70
2.	Synthèse des ADN complémentaires par transcription inverse .....	71
3.	PCR quantitative (qPCR) .....	71
B.	<i>Approche transcriptomique à large échelle par puce à ADN CATMA</i> .....	72
1.	Principe de la puce CATMA .....	72
2.	Méthode microarray CATMA .....	73
3.	Analyse statistique des données microarray .....	73
4.	Dépôt des données microarray .....	74
<b>X.</b>	<b>Techniques d'études des protéines</b> .....	<b>74</b>
A.	<i>Dosage des protéines totales</i> .....	74
1.	Dosage à 280 nm .....	75

2.	Dosage selon la méthode dite de Bradford.....	75
<b>B.</b>	<i>Mesure des activités phosphoribosyltransférases (PRTases) .....</i>	<b>75</b>
1.	Extraction .....	75
2.	Mesure d'activité PRTase (QPT et NaPT).....	76
<b>C.</b>	<i>Mesure de l'activité nitrate réductase.....</i>	<b>77</b>
1.	Extraction .....	77
2.	Mesure de l'activité extractible.....	77
<b>XI.</b>	<b>Techniques d'études métabolomiques .....</b>	<b>78</b>
<b>A.</b>	<i>Dosage du pool d'antioxydants cellulaires .....</i>	<b>78</b>
1.	Extraction acide .....	79
2.	Extraction alcaline .....	79
3.	Dosage des chlorophylles dégradées : les phéophytines.....	80
4.	Dosage des nucléotides à pyridine.....	80
5.	Dosage de l'ascorbate .....	81
6.	Dosage du glutathion .....	82
<b>B.</b>	<i>Dosage des composés thiolés.....</i>	<b>82</b>
<b>C.</b>	<i>Extraction des fractions solubles aqueuses foliaires .....</i>	<b>83</b>
<b>D.</b>	<i>Mesure des ions nitrate.....</i>	<b>83</b>
<b>E.</b>	<i>Mesure des ions ammonium .....</i>	<b>84</b>
<b>F.</b>	<i>Dosage de l'acide salicylique .....</i>	<b>84</b>
1.	Extraction .....	84
2.	Hydrolyse acide .....	85
3.	Quantification des pools libres et totaux .....	85
4.	Calcul du rendement de l'extraction par comptage radioactif .....	86
5.	Calcul des pools conjugués.....	86
<b>G.</b>	<i>Dosage des acides aminés par technique HPLC.....</i>	<b>86</b>
1.	Extraction méthanolique des métabolites .....	86
2.	Quantification absolue des acides aminés en HPLC.....	87
<b>H.</b>	<i>Profilage métabolique par technique GCMS .....</i>	<b>89</b>
1.	Extraction méthanolique des métabolites .....	89
2.	Préparation du réactif de méthylation et du mélange d'alcane .....	89
<b>I.</b>	<i>Quantification ciblée de nucléotides et cofacteurs par LCMS .....</i>	<b>91</b>
1.	Extraction perchlorique des métabolites .....	91
2.	Neutralisation des extraits .....	92
3.	Pré-purification des échantillons par extraction en phase solide (SPE).....	92
4.	Analyses LC-TOF .....	93
<b>J.</b>	<i>Lyophilisation des échantillons et calcul du rapport MS/MF.....</i>	<b>94</b>
<b>K.</b>	<i>Analyses par couplage EA-IRMS .....</i>	<b>94</b>
<b>XII.</b>	<b>Approches physiologiques.....</b>	<b>96</b>
<b>A.</b>	<i>Test de résistance à la bactérie Pst .....</i>	<b>96</b>
1.	Inoculation des souches bactériennes virulente et avirulente .....	96
2.	Échantillonnage .....	96
<b>B.</b>	<i>Analyse de la mort cellulaire .....</i>	<b>97</b>
1.	Coloration des cellules mortes au bleu de trypan.....	97
2.	Mesure conductimétrique de la fuite d'électrolytes.....	98
<b>C.</b>	<i>Mesures des échanges gazeux .....</i>	<b>98</b>
<b>XIII.</b>	<b>Analyses <i>in silico</i> .....</b>	<b>99</b>
<b>A.</b>	<i>Les sites de bases de données génomiques et protéomiques.....</i>	<b>100</b>
<b>B.</b>	<i>Genevestigator .....</i>	<b>100</b>

C.	MapMan® .....	101
D.	MeV .....	101
E.	Brenda .....	101

## RESULTATS

<b>I.</b>	<b>Obtention d'un système inductible de surproduction <i>in planta</i> de NAD chez <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>102</b>
A.	<i>But de l'étude : surexpression du gène nadC d'Escherichia coli chez Arabidopsis thaliana ..</i>	<i>102</i>
B.	<i>Caractérisation moléculaire des lignées nadC.....</i>	<i>103</i>
C.	<i>Mesures d'activités phosphoribosyltransférases (PRTases) sur les lignées nadC.....</i>	<i>103</i>
D.	<i>Un système inductible de surproduction du NAD chez Arabidopsis thaliana .....</i>	<i>104</i>
E.	<i>Conclusion et discussion .....</i>	<i>105</i>
1.	La surproduction de QPT bactérienne permet chez les plantes d'augmenter les teneurs en NAD en présence de quinolinate .....	105
2.	Le quinolinate non métabolisé conduit à un milieu cellulaire plus oxydant.....	106
<b>II.</b>	<b>Conséquences métaboliques d'une augmentation inductible de NAD chez <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>107</b>
A.	<i>La métabolomique ou l'étude du métabolome .....</i>	<i>107</i>
B.	<i>Approches métabolomiques retenues dans cette étude .....</i>	<i>108</i>
C.	<i>La surproduction de NAD est associée à une modification du métabolisme primaire cellulaire.....</i>	<i>109</i>
1.	Perturbation de la balance azotée : modification des pools d'aspartate et de ses dérivés. ....	109
2.	Un enrichissement en xylose est observé chez les lignées qui accumulent du NAD ..	109
3.	L'apport de quinolinate induit une accumulation d'acide nicotinique .....	110
D.	<i>Discussion et conclusion .....</i>	<i>110</i>
1.	Une dérégulation de la biosynthèse du NAD perturbe le métabolisme carboné et azoté chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	110
2.	Les teneurs élevées en NAD sont associées à une accumulation de xylose .....	113
3.	Le traitement au quinolinate entraîne une forte augmentation de nicotinate .....	113
<b>III.</b>	<b>Réponses transcriptomiques à l'accumulation de NAD chez <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>115</b>
A.	<i>Pourquoi une étude globale du transcriptome ? .....</i>	<i>115</i>
B.	<i>Analyses transcriptomiques.....</i>	<i>115</i>
1.	La technologie CATMA .....	115
2.	Comparaison de type fer à cheval .....	116
C.	<i>Classification hiérarchique .....</i>	<i>116</i>
D.	<i>Une réponse transcriptomique hautement NAD-dépendante .....</i>	<i>117</i>
1.	Catégories fonctionnelles affectées par l'accumulation en NAD .....	118
2.	L'augmentation foliaire en NAD induit l'expression de nombreux gènes liés aux stress, notamment biotiques.....	118
3.	Les teneurs élevées en NAD impactent également la transcription de gènes impliqués dans la signalisation calcique et dans la sénescence .....	119
4.	Une régulation transcriptionnelle du métabolisme végétal est observée consécutivement à l'augmentation en NAD.....	120
5.	L'inhibition NAD-dépendante de l'expression des gènes est peu représentée, et de faible amplitude. ....	120
6.	Le traitement au quinolinate implique une réponse transcriptomique faible .....	121
E.	<i>Validation des données CATMA par confirmation RT-qPCR.....</i>	<i>121</i>
F.	<i>Comparaison avec d'autres données transcriptomiques .....</i>	<i>122</i>

G.	<i>Conclusion et discussion</i> .....	123
1.	Une réponse transcriptomique étroitement liée au stress biotique .....	123
2.	Le NAD affecte l'expression de gènes liés au métabolisme .....	124
3.	Effet toxique du quinolinate.....	126
<b>IV.</b>	<b>L'enrichissement en NAD élicite les réactions de défense conduisant à une résistance à la bactérie avirulente <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato AvrRpm1</i></b> .....	<b>127</b>
A.	<i>Pourquoi une étude physiologique des interactions plantes nadC-pathogènes?</i> .....	127
B.	<i>Choix de la bactérie phytopathogène <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (Pst)</i> .....	127
C.	<i>L'augmentation en NAD entraîne une résistance à Pst-AvrRpm1</i> .....	128
D.	<i>La résistance est corrélée à l'activation de marqueurs de défense</i> .....	129
E.	<i>Le métabolisme du NAD est perturbé au cours de l'infection</i> .....	130
F.	<i>L'accumulation de SA hors infection n'est pas corrélée à un phénotype de mort cellulaire</i> . .....	131
G.	<i>Conclusion et discussion</i> .....	132
1.	Les niveaux augmentés en NAD stimulent les mécanismes de résistance gène-pour-gène associés au SA .....	132
2.	La résistance bactérienne observée est spécifiquement due à un effet du NAD et non pas de ses dérivés.....	133
3.	L'accumulation de SA hors infection ne permet pas d'expliquer la résistance à <i>Pst-AvrRpm1</i> .....	134
<b>V.</b>	<b>Caractérisations moléculaire et phénotypique de lignées mutantes ADN-T et surexpresseur constitutivement affectées dans la production de la QPT d'<i>Arabidopsis thaliana</i></b> .. .....	<b>136</b>
A.	<i>Buts de l'étude</i> .....	136
B.	<i>Obtention de plantes mutantes d'<i>Arabidopsis thaliana</i> homozygotes pour l'insertion de l'ADN-T dans le gène QPT</i> .....	136
C.	<i>Surexpression constitutive de l'ADNc codant la QPT d'<i>Arabidopsis thaliana</i></i> .....	137
D.	<i>La croissance est altérée chez les lignées N57 et Q5</i> .....	138
E.	<i>Dérégulation de la production de QPT chez les plantes mutantes</i> .....	138
F.	<i>La production de QPT influence les niveaux stationnaires de nucléotides à pyridine</i> ....	139
G.	<i>Analyses de l'expression des gènes du métabolisme du NAD</i> .....	140
H.	<i>Conclusion et discussion</i> .....	141
1.	Le mutant N57 homozygote pour le gène QPT est non létal .....	141
2.	La QPT exerce un contrôle clé sur l'homéostasie rédox et du NAD .....	142
3.	L'altération du pool de nucléotides à pyridine affecte la croissance des plantes mutantes N57 et Q5. ....	144
<b>VI.</b>	<b>Conséquences physiologiques d'une dérégulation de la production de QPT d'<i>Arabidopsis thaliana</i> : perturbations de la balance (C/N)</b> .....	<b>147</b>
A.	<i>But de l'étude</i> .....	147
B.	<i>Les pools altérés de NAD/P(H) ne sont pas associés à une modification des paramètres photosynthétiques</i> .....	147
C.	<i>La modification de la production de NAD affecte les niveaux de métabolites carbonés et azotés</i> .....	148
D.	<i>Les niveaux de nitrates, d'ammonium et de NR sont modifiés dans les plantes mutantes</i> ... .....	151
E.	<i>La dérégulation des niveaux de NAD s'accompagne d'une augmentation du flux d'azote in vivo</i> .....	152
F.	<i>Les transcrits associés au transport du nitrate et de l'ammonium sont modulés chez les lignées N57 et Q5</i> .....	153

G.	<i>Le système GS/GOGAT est induit par l'altération des niveaux de nucléotides à pyridine.....</i>	155
H.	<i>Conclusion et discussion .....</i>	156
1.	<i>Les mutants N57 et Q5 présentent un métabolisme primaire <b>profondément</b> perturbé ..</i>	156

### CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

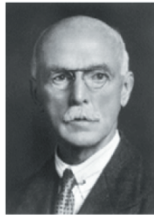
I.	<b>Conclusion générale et perspectives : les lignées <i>nadC</i> .....</b>	<b>164</b>
A.	<i>Effets spécifiques du NAD.....</i>	164
B.	<i>Perspectives au travail réalisé sur les lignées <i>nadC</i>.....</i>	165
II.	<b>Conclusion générale et perspectives: les lignées N57 et Q5 .....</b>	<b>168</b>
A.	<i>Une augmentation constitutive modérée des teneurs en NAD.....</i>	168
B.	<i>Les effets d'une augmentation constitutive du pool de NAD .....</i>	169
C.	<i>Effet d'une diminution de la synthèse de novo de NAD .....</i>	169
D.	<i>Perspectives.....</i>	171

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

.....	<b>172</b>
-------	------------

### ANNEXES

**1904**  
Découverte dans des extraits de levures du *cozymase*, un composé de faible masse moléculaire indispensable à la fermentation des sucres

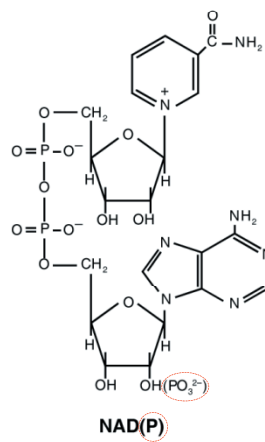


**Sir Arthur Harden**

**1920 - 1935**  
Le *cozymase* contient deux nucléotides reliés par un pont diphosphate



**Hans von Euler-Chelpin**



**NAD(P)**



**Otto Warburg**

**1936**  
Le *cozymase* participe au transfert d'hydrogène



**Arthur Kornberg**

**1948**  
Le NAD est synthétisé à partir du NMN et de l'ATP par la NMNAT

**Figure 1. Lauréats du Prix Nobel ayant contribué à la découverte du NAD et de ses fonctions.** Les découvertes importantes figurent pour chaque scientifique à côté de leur photo respective. Au centre : structure chimique du NAD(P). AMP : adénosine monophosphate ; NAD(P) : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) ; NMN : nicotinamide mononucléotide ; NMNAT : nicotinamide mononucléotide adényltransférase. Les clichés photographiques ont été obtenus par [Berger et al. \(2004\)](#) auprès de la Fondation Nobel.

Depuis la découverte en 1904 par Sir Arthur Harden et William Young d'un cofacteur accélérant la fermentation alcoolique chez les levures (Harden et Young, 1906), le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) ne cesse d'intriguer les scientifiques (**Figure 1**). Les deux biochimistes britanniques baptisèrent ce facteur fermentique *cozymase*. Après de fastidieuses étapes de purification, Hans von Euler-Chelpin proposa une ébauche de la structure du *cozymase* avec deux nucléotides liés par un pont diphosphate (von Euler, 1930). C'est au scientifique allemand Otto Warburg dans les années 1930 que l'on doit l'identification de la fonction oxydoréductrice du NAD au niveau de son groupement nicotinamide (Warburg et Christian, 1936). Dans de nombreux compartiments subcellulaires, les formes oxydée ou réduite du NAD vont servir aux réactions de transhydrogénation catalysées par une batterie d'oxydoréductases. En 1938, Conrad Elvehjem réalisa une purification hépatique de la niacine (vitamine B3) qui contient du nicotinate et du nicotinamide (Elvehjem *et al.*, 1938). Ses travaux ultérieurs fournirent les premières preuves d'une synthèse du NAD à partir de cette vitamine (Axelrod *et al.*, 1939). Au début des années 1940, Arthur Kornberg contribua grandement à la compréhension du métabolisme du NAD en découvrant la première enzyme de biosynthèse (Kornberg, 1948). Un an plus tard, les biochimistes américains Morris Friedkin et Albert L. Lehninger suggérèrent un lien entre le NADH et certaines voies métaboliques comme le cycle de Krebs qui génère du pouvoir réducteur ensuite utilisé pour la production d'ATP par phosphorylation oxydative (Friedkin et Lehninger, 1949). L'histoire du NAD se poursuivra à la fin des années 1950 avec Jack Preiss et Philip Handler qui déterminèrent deux intermédiaires métaboliques stables et trois enzymes de synthèse du NAD (Preiss et Handler, 1958a ; 1958b). En leur honneur, la voie de biosynthèse dite *de novo* sera communément appelée *voie de Preiss-Handler*.

Ce n'est que durant la dernière décennie que la connaissance des rôles du NAD dans la signalisation cellulaire s'est considérablement enrichie (Berger *et al.*, 2004 ; Hunt *et al.*, 2004 ; Noctor *et al.*, 2006). L'identification d'enzymes catabolisant le NAD (désacétylases, ADP-ribose polymérases, etc.) implique dorénavant ce coenzyme comme régulateur métabolique universel, en aval d'un florilège de voies d'anabolisme et de catabolisme.

L'état des connaissances actuelles sur le métabolisme du NAD est loin d'être exhaustif. Un siècle après la découverte du *cozymase*, et quatre lauréats du Prix Nobel, cette petite molécule nous livre quelques uns de ses secrets, à travers ce travail de thèse...





# Introduction bibliographique



## I. Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD)

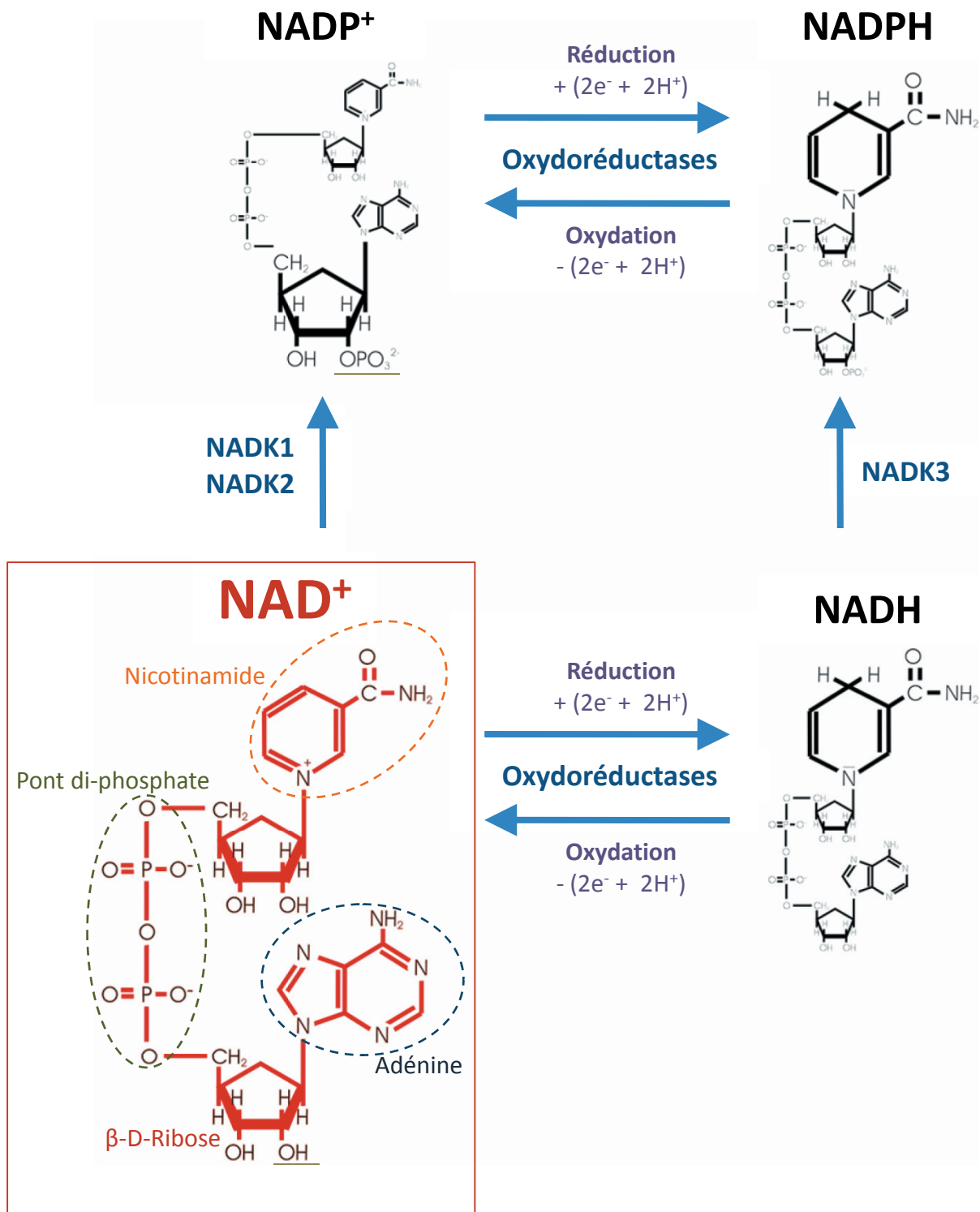
---

Du grec *Bios* "vie" et *Logos* "doctrine", la biologie désigne la science des êtres vivants. La vie est la capacité à maintenir et reproduire une structure complexe en dépit d'un nombre certain de contraintes thermodynamiques (Schrödinger, 1986). C'est aussi la capacité qu'ont les biomolécules et les atomes de s'organiser en structures autoreproductibles. Le monde vivant est pensé comme une évolution sans fin vers plus de complexité dans les dialogues moléculaires sous-jacents aux fonctions vitales. Malgré cette course effrénée vers des réseaux d'interactions toujours plus denses, il n'en demeure pas moins fascinant que certains grands principes ont prouvé une prodigieuse utilité, en endurant les périodes d'évolution pour se retrouver aujourd'hui ubiquistes pour toutes les espèces. Ces principes incluent un ensemble de petites molécules cofacteurs qui apparaissent comme une condition *sine qua non* au maintien de la vie, à travers le fonctionnement des voies métaboliques et de leurs processus régulateurs. C'est notamment le cas des acides aminés et de leurs dérivés comme les nucléotides à pyridine ou encore le glutathion ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine).

### A. Structure de la molécule

---

Le NAD, encore appelé nicotinamide adénine dinucléotide, est un coenzyme transducteur d'énergie présent dans toutes les cellules à des concentrations millimolaires (Noctor *et al.*, 2006). Ce nucléotide à pyridine comprend deux nucléotides. Le premier est un AMP (5' adénosine monophosphate) où l'on reconnaît l'adénine, le ribose et un premier groupement phosphate. Ce phosphate est lié par une liaison anhydride d'acide à un deuxième résidu phosphate. Vient ensuite par une liaison ester le  $\beta$ -D-ribose du deuxième nucléotide qui est un nicotinamide (aussi appelé niacine, vitamine B3 ou PP). Celui-ci est lié par une liaison N-osidique au noyau azoté de l'acide nicotinique (ou nicotinate). Enfin, la



**Figure 2. Réactions de transfert d'électrons du NAD(P).** Le couple rédox NAD<sup>+</sup>/NADH est indispensable à l'activité d'oxydoréductases impliquées dans divers processus métaboliques. Le NAD<sup>+</sup> peut être phosphorylé en NADP<sup>+</sup> par des NAD kinases (NADK) sur le groupement 2'-hydroxyle de l'adénosine ribose. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe trois isoformes de NADK et NADK3 utilise préférentiellement le NADH comme substrat.

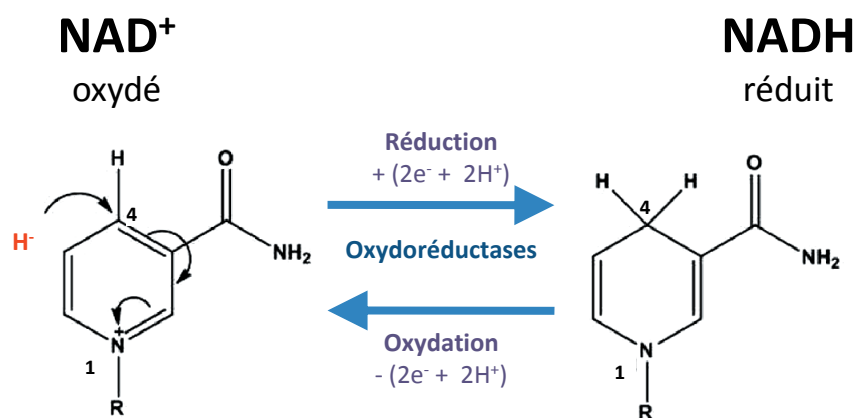
fonction acide du nicotinate est amidifiée par une molécule d'ammoniac (**Figure 2**). L'ensemble de cette structure représente une masse de 664 Daltons (Pollack *et al.*, 2007).

Le NAD existe sous une forme phosphorylée appelée NAD phosphate (NADP), au niveau du 2' hydroxyle du ribose du nucléotide portant l'adénine (**Figure 2**). A l'égal du NAD, le NADP peut être oxydé (NADP<sup>+</sup>) ou réduit (NADPH) et possède également des fonctions de réduction-oxydation, communément appelées *rédox* (Belenky *et al.*, 2007). NAD et NADP se distingueraient surtout au niveau de leur utilisation dans la cellule. Le NADP, utilisé comme agent de réduction, est plutôt impliqué dans des processus de biosynthèse. Par exemple, lors de la photosynthèse, au niveau du stroma du chloroplaste, le ratio NADP/NAD augmente à la lumière et le NADP<sup>+</sup> sert d'accepteur terminal d'électrons (Heber et Santarius, 1965). Notons également l'importance du NADP dans d'autres métabolismes tels que la biosynthèse des acides gras (Nicholls et Ferguson, 2002). En ce qui concerne le NAD, son utilisation se situe souvent au niveau des voies de catabolisme où il agit comme oxydant.

### B. Propriétés physico-chimiques

---

La principale fonction de ce coenzyme est de transporter l'hydrogène, produit de nombreuses oxydoréductases. Le NAD peut ainsi accepter ou donner des électrons au cours de réactions rédox. Ce transfert d'électron est réalisé au niveau de la partie nicotinamide du NAD. Grâce à un apport de deux électrons et d'un hydrogène sous la forme hydrure ( $2e^- + H^+$ ) au niveau du noyau C<sub>4</sub> du nicotinamide, le NAD<sup>+</sup> est alors réduit en NADH (**Figure 3**) (Metzler, 2001). Le NAD<sup>+</sup> oxydé et le NADH réduit constituent le couple d'oxydoréduction NAD<sup>+</sup>/NADH et ce couple est généralement désigné par NAD sans différenciation entre forme oxydée et réduite (Pollak *et al.*, 2007). Le potentiel rédox standard de ce couple, noté E°, mesuré en référence à une électrode normale à hydrogène (ENH, pH 7), est de - 320 mV. L'équilibre entre la forme oxydée et réduite est appelé rapport NAD<sup>+</sup>/NADH (ou NAD/NADH) et constitue une composante importante de ce qui est communément nommé l'état rédox de la cellule. Le terme état rédox décrit l'équilibre oxydoréducteur cellulaire des composés



**Figure 3. Réactions d'oxydoréduction du NAD.** Le NAD<sup>+</sup> est réduit en NADH et de façon réversible le NADH est oxydé en NAD<sup>+</sup>. H<sup>+</sup> : apport d'un hydrogène sous la forme hydrure (2e<sup>-</sup> + H<sup>+</sup>) au niveau du noyau C<sub>4</sub> du nicotinamide ; R : groupement adénine dinucléotide.

thiolés (glutathion : GSH/GSSG, protéines avec groupements SH, etc.) ainsi que des nucléotides à pyridine ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  et  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ). L'état rédox influence nombre de processus métaboliques, y compris la signalisation cellulaire et la régulation de la transcription des gènes. En d'autres termes, la mesure de ce rapport reflète les activités métaboliques et le bon état général cellulaires. Pour ce qui est du NAD, il est le plus souvent très oxydé dans les cellules vivant en aérobiose, avec un rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  variant de 8 à 10. Le potentiel réel d'oxydoréduction est alors plus élevé, soit  $E^\circ$  entre - 250 et - 290 mV (Schafer et Buettner, 2001).

### C. Localisation subcellulaire et concentration physiologique

---

Malgré le peu de données disponibles dans la littérature concernant la localisation fine du NAD au niveau cellulaire, il semblerait qu'il existe des réserves de ce dinucléotide au sein de certains compartiments (Sauve, 2008). Notamment, la majorité du NAD se retrouverait au niveau de la mitochondrie (0.6 mM dans le cytosol et 2 mM dans les mitochondries de pois) (Igamberdiev et Gardeström, 2003). Sa synthèse est vraisemblablement très importante dans le noyau où le NAD pourrait diffuser passivement à travers les pores nucléaires pour ensuite être redistribué dans le cytosol. De nombreuses études récentes apportent plusieurs données sur les concentrations précises en NAD dans les différents compartiments subcellulaires. Chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), les teneurs en NAD sont estimées entre 1 et 2 mM (Blinova *et al.*, 2008) et à 0.3 mM dans des érythrocytes (Yamada *et al.*, 2006). Il est important de souligner qu'une grande partie du pool de NAD serait liée aux protéines (Zhang *et al.*, 2002 ; Kasimova *et al.*, 2006) .

Chez les végétaux, les rapports  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  et  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  diffèrent significativement entre cytosol et chloroplaste. Dans ce dernier, l'activité photosynthétique à la lumière conduit à une forte réduction des nucléotides à pyridine. En effet, chez l'épinard et la betterave à sucre, 40 % du pool total de NADPH se retrouve au niveau du plaste et peut même atteindre 60 à 85 % à la lumière, alors que *virtuellement* tout le  $\text{NADP}^+$  cellulaire se





situé dans le chloroplaste (Heber et Santarius, 1965). Des valeurs similaires pour le NADPH ont été retrouvées dans des protoplastes foliaires d'orge, avec des teneurs à la lumière proches de 70 - 80 % dans le chloroplaste et de 20 - 30 % dans le cytosol. En termes de concentration, ceci correspond à 0.8 mM et 0.35 mM respectivement (Wigge *et al.*, 1993). En outre, la plupart du pool de NAD apparaît sous forme oxydée  $\text{NAD}^+$  à la fois dans le plaste et le cytosol, avec des niveaux en NADH de l'ordre de 8 % du pool total NAD(H) dans le chloroplaste et 2 % dans le cytosol. Comme pour le NADP, la lumière induit une réduction du  $\text{NAD}^+$  en NADH dans le chloroplaste, alors que les niveaux cytosoliques ne varient pas au cours de l'illumination (Heber et Santarius, 1965). Chez l'orge, la distribution entre les différents compartiments cellulaires est sensiblement différente pour le NAD(H) (Wigge *et al.*, 1993). En effet, environ 30 - 40 % du NAD(H) est contenu dans le chloroplaste, 45 - 55 % dans le cytosol et 10 - 15 % dans la mitochondrie. Les concentrations estimées sont respectivement 0.4, 0.65 et 2.4 mM. Aussi, puisque la membrane chloroplastique reste non perméable à une application externe de nucléotides à pyridine, un mélange direct des deux pools est exclu (Hunt *et al.*, 2004). De ce fait, les pools de nucléotides à pyridine dans chaque organelle semblent être spécifiquement ajustés selon leurs fonctions intrinsèques comme par exemple la synthèse de forme activées de l'oxygène, appelée ROS pour *Reactive Oxygen Species*, au niveau de la membrane plasmique grâce aux activités de NADPH oxydases (décrites plus loin), mais également la séquestration de ROS dans la mitochondrie, ou encore la synthèse de phosphoglycérate lors de la photosynthèse dans le chloroplaste. A la différence des cellules animales, les mitochondries chez les plantes possèderaient des systèmes réversibles d'assimilation du  $\text{NAD}^+$  externe (Douce et Neuburger, 1989), ce qui permettrait d'ajuster les rapports  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  entre le noyau et le cytosol (Fjeld *et al.*, 2003). Ainsi, des histones désacétylases nucléaires comme SIR2 (*silent information regulator 2*) pourraient réguler l'expression de gènes en réponse à des changements de l'état rédox du cytosol.

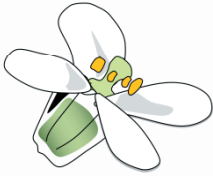
## Synthèse *de novo* du NAD

## Recyclage du NAD et de ses dérivés

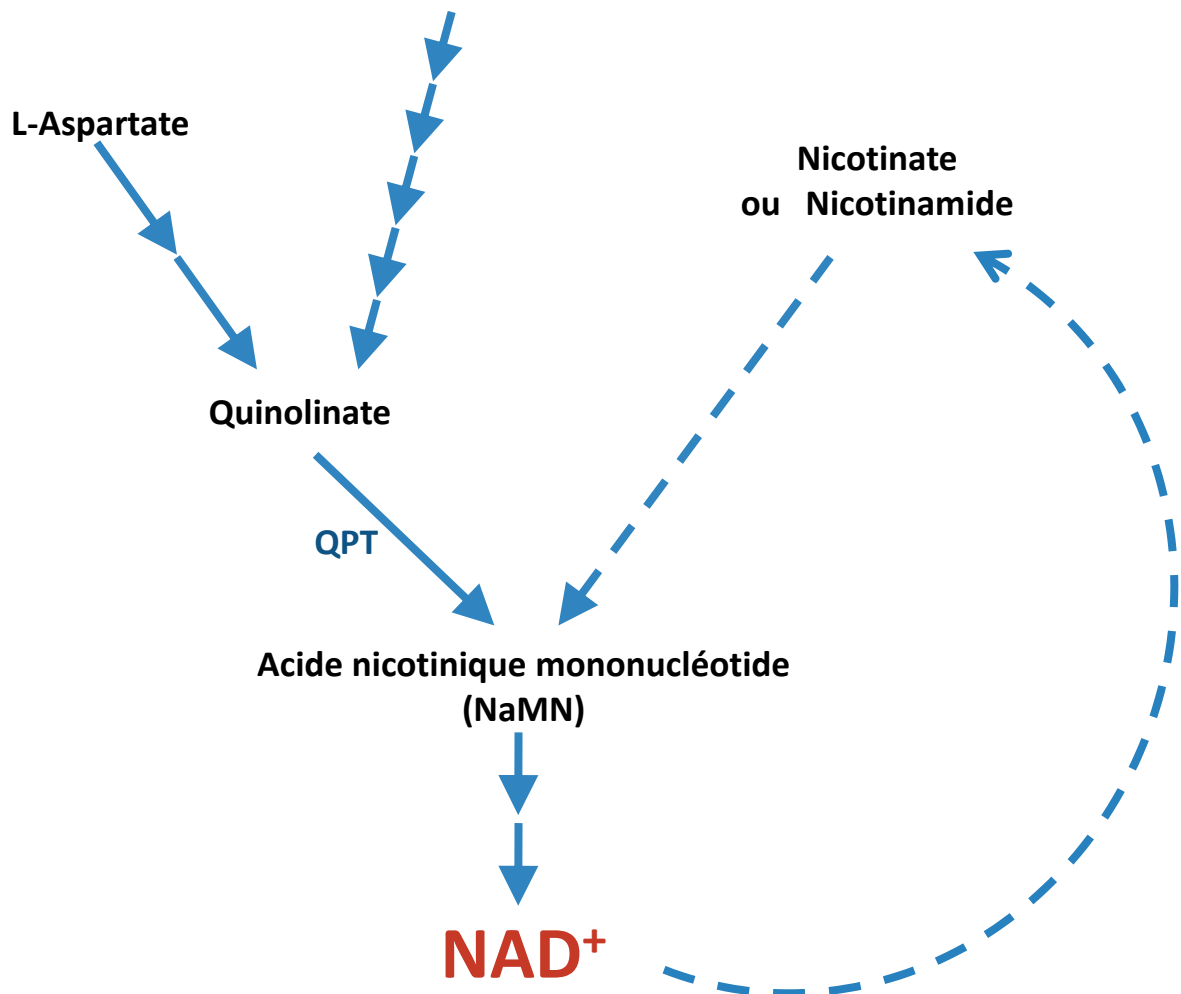
Plantes et bactéries

Animaux

Eucaryotes  
et certaines bactéries



L-Tryptophane



**Figure 4. Vue globale simplifiée des voies de synthèse et de recyclage intervenant dans le métabolisme du NAD chez différents organismes.** Chez les bactéries et les plantes, la biosynthèse du NAD nécessite du L-Aspartate alors que chez les Animaux, celle-ci utilise le L-Tryptophane comme précurseur. Chez les champignons, les deux voies peuvent coexister. Les voies de biosynthèse aboutissent à un produit commun, le quinolinate, ensuite métabolisé en trois étapes enzymatiques pour produire du NAD. QPT : quinolinate phosphoribosyltransférase.

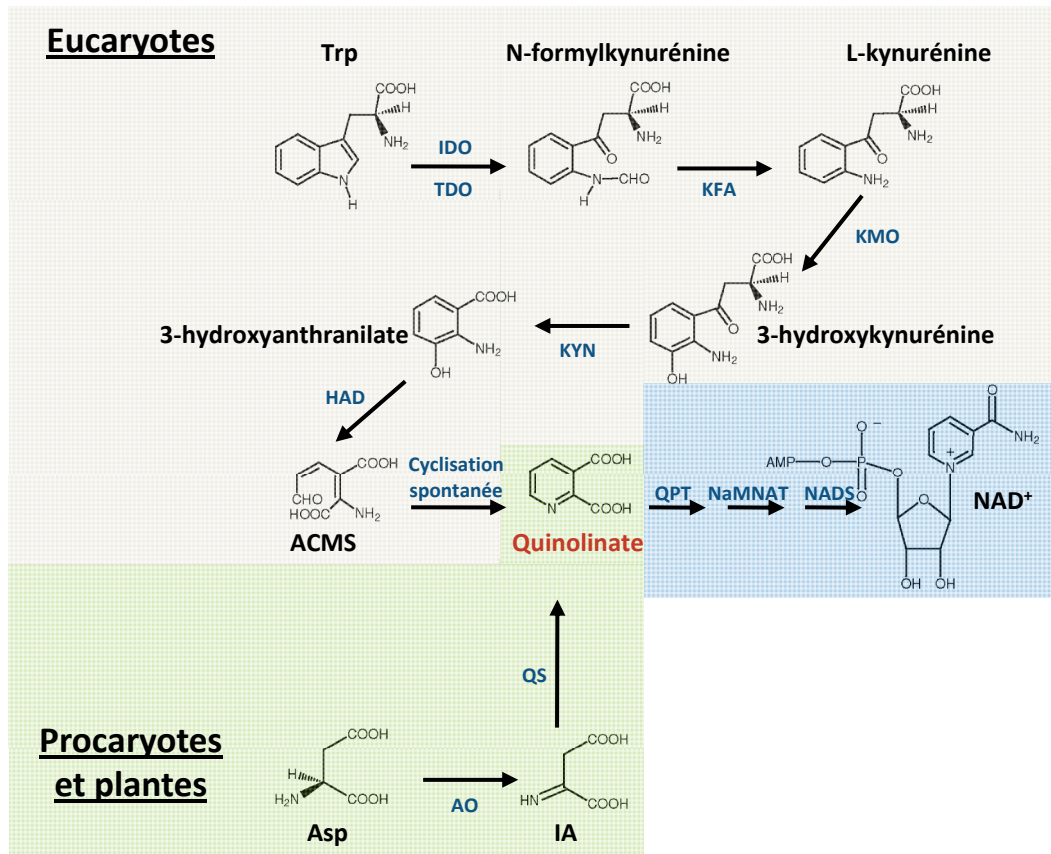
## II. Biosynthèse du NAD

---

Pendant longtemps, la communauté scientifique ne s'est préoccupée que du seul aspect rédox des nucléotides à pyridine. L'intérêt d'investiguer leur métabolisme n'est apparu que récemment avec un nombre grandissant de données indiquant un rôle majeur dans la signalisation cellulaire (Berger *et al.*, 2004 ; Hunt *et al.*, 2004). Chez les Animaux et la levure, la plupart des voies de synthèse et catabolisme du NAD sont bien caractérisées, avec un effort considérable porté à la connaissance des enzymes, de leur structure primaire et de leur régulation (Emanuelli *et al.*, 1999 ; 2001 ; Fukuoka et Shibata, 1999 ; Kawai *et al.*, 2001; Lerner *et al.*, 2001; Ghislain *et al.*, 2002 ; Raffaelli *et al.*, 2002 ; Rongvaux *et al.*, 2002 ; Schweiger *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2003 ; Zhang, 2003). Malgré un manque important dans la connaissance de ces mêmes enzymes chez les plantes, l'accès au génome de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse et la dégradation de la molécule de NAD.

Le NAD peut être synthétisé selon deux voies métaboliques (**Figure 4**) : (i) une voie dite *de novo*, à partir de différents acides aminés selon l'organisme considéré ; (ii) une voie de recyclage, encore appelée voie de secours, qui "recycle" des molécules issues du NAD comme le nicotinamide (NAM) ou l'acide nicotinique (nicotinate, NA).

A la différence des gènes codant les enzymes de catabolisme du NAD (pour lesquels il existe souvent plusieurs copies), les gènes responsables de la biosynthèse *de novo* des nucléotides à pyridine sont présents en une seule voire un nombre faible de copies (Hunt *et al.*, 2004 ; Noctor *et al.*, 2006). La disponibilité du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis récemment de comparer les séquences déjà disponibles pour d'autres génomes Animaux ou bactériens et ainsi de déduire les voies métaboliques potentiellement impliquées dans la synthèse et le catabolisme du NAD chez les végétaux supérieurs.



**Figure 5. Les voies de synthèse menant au quinolinate.** Fond beige : synthèse du quinolinate à partir du tryptophane (Trp) chez les Animaux. Cette biosynthèse débute par une conversion du Trp en N-formylkynurénine par l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) ou la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO). Quatre étapes réactionnelles permettent la transformation de la N-formylkynurénine en acide 2-amino-3-carboxymuconique-6-semialdéhyde (ACMS), chimiquement instable, qui subit une cyclisation spontanée pour donner du quinolinate (KFA : kynurénine formamidase ; KMO : 3-monoxygénase ; KYN : kynuréninase ; HAD : 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase). Fond vert : synthèse de quinolinate à partir de l'aspartate (Asp) chez les plantes et les bactéries. L'Asp est métabolisé en iminoaspartate (IA) via l'aspartate oxydase (AO). Le quinolinate est ensuite produit par la quinolinate synthase (QS) à partir de l'IA. Les étapes de biosynthèse suivantes sont communes entre les Animaux et les plantes (fond bleu). La quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT) synthétise l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN) qui sera ensuite métabolisé en acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD) par la nicotinamide mononucléotide/NaMN adényltransférase (NMNAT). La dernière étape est une amidation du NaAD en NAD<sup>+</sup> par la NAD synthétase (NADS). D'après Kurnasov *et al.* (2003a).

## A. Synthèse dite *de novo*

---

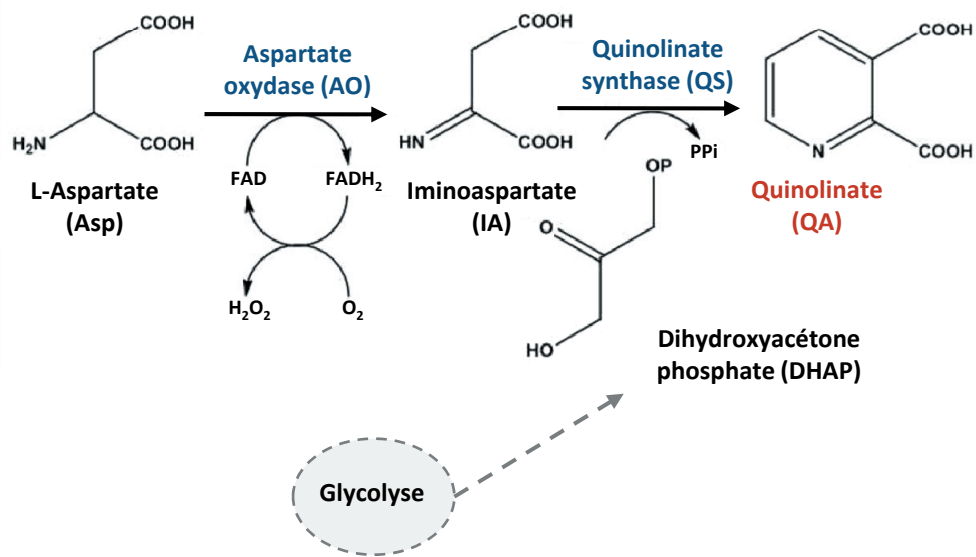
La voie principale de synthèse du NAD utilise comme précurseur l'acide quinolinique encore appelé acide pyridine-2'3-dicarboxylique ou quinolinate (QA). Selon l'organisme, cette molécule est synthétisée à partir de deux acides aminés différents. Chez la plupart des Eucaryotes, à l'exception des plantes, le QA est produit à partir du L-Tryptophane (Trp), alors que chez les végétaux supérieurs et de nombreux procaryotes, sa synthèse nécessite le L-Aspartate (Asp) (**Figure 5**).

### 1. Synthèse du quinolinate à partir du tryptophane

---

Chez les Eucaryotes et chez certaines bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia fungorum*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Thermobifida fusca*, *Ralstonia metallidurans*, etc.) (Kurnasov *et al.*, 2003a ; 2003b), le QA est formé à partir du Trp *via* une voie aérobie appelée voie des kynurénines (**Figure 5**). Une séquence réactionnelle en cinq étapes enzymatiques est nécessaire, suivie d'une cyclisation spontanée permettant la production de l'acide quinolinique (Kurnasov *et al.*, 2003a ; 2003b).

La voie des kynurénines débute par une oxydation du Trp en N-formylkynurénine, catalysée par deux enzymes : la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) ou l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Higuchi et Hayaishi, 1967). Ces deux dioxygénases diffèrent par leur spécificité de substrats. La TDO utilise spécifiquement le L-Trp, alors que l'IDO est capable d'oxyder des analogues du Trp (D-Trp, tryptamine, sérotonine, etc.). La découverte de la structure tridimensionnelle de ces deux enzymes a permis de mieux cerner les mécanismes réactionnels sous-jacents (Forouhar *et al.*, 2007). La N-formylkynurénine peut ensuite soit s'hydrolyser spontanément en L-kynurénine, soit être déformylée par la kynurénine formamidase (KFA), enzyme très peu connue jusqu'alors, et qui a fait l'objet d'une étude biochimique récente indiquant des homologies de séquence avec des estérases et lipases (Wogulis *et al.*, 2008). La troisième étape enzymatique de la voie des kynurénines est une



**Figure 6. La synthèse de quinolinate à partir de l'aspartate.** Chez les plantes et les bactéries, la synthèse de quinolinate est réalisée à partir de l'aspartate en deux étapes enzymatiques catalysées par l'aspartate oxydase (AO) puis la quinolinate synthase (QS). L'AO nécessite de la flavine adénine dinucléotide (FAD) et du dioxygène (O<sub>2</sub>) pour synthétiser de l'iminoaspartate (IA). La QS quant à elle métabolise l'IA en QA en présence de dihydroxyacétone phosphate (DHAP) avec libération de pyrophosphate (PPI). Le DHAP peut provenir de la glycolyse.

oxydation de la L-kynurénine en 3-hydroxykynurénine par la kynurénine 3-monooxygénase (KMO). Cette monooxygénase possède un cofacteur flavine adénine dinucléotide (FAD) lié de façon non covalente et régénéré en utilisant le NADPH. En libérant de la L-alanine, une kynuréninase (KYN) va hydrolyser la 3-hydroxykynurénine en acide 3-hydroxyanthranilique. Cet intermédiaire sera enfin oxydé en acide 2-amino-3-carboxymuconique-6-semialdéhyde (ACMS) par la 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase (HAD), une extradiol-dioxygénase à atome de fer. Pour finir, une cyclisation spontanée de l'ACMS permet de synthétiser le quinolinate (**Figure 5**) (Colabroy et Begley, 2005).

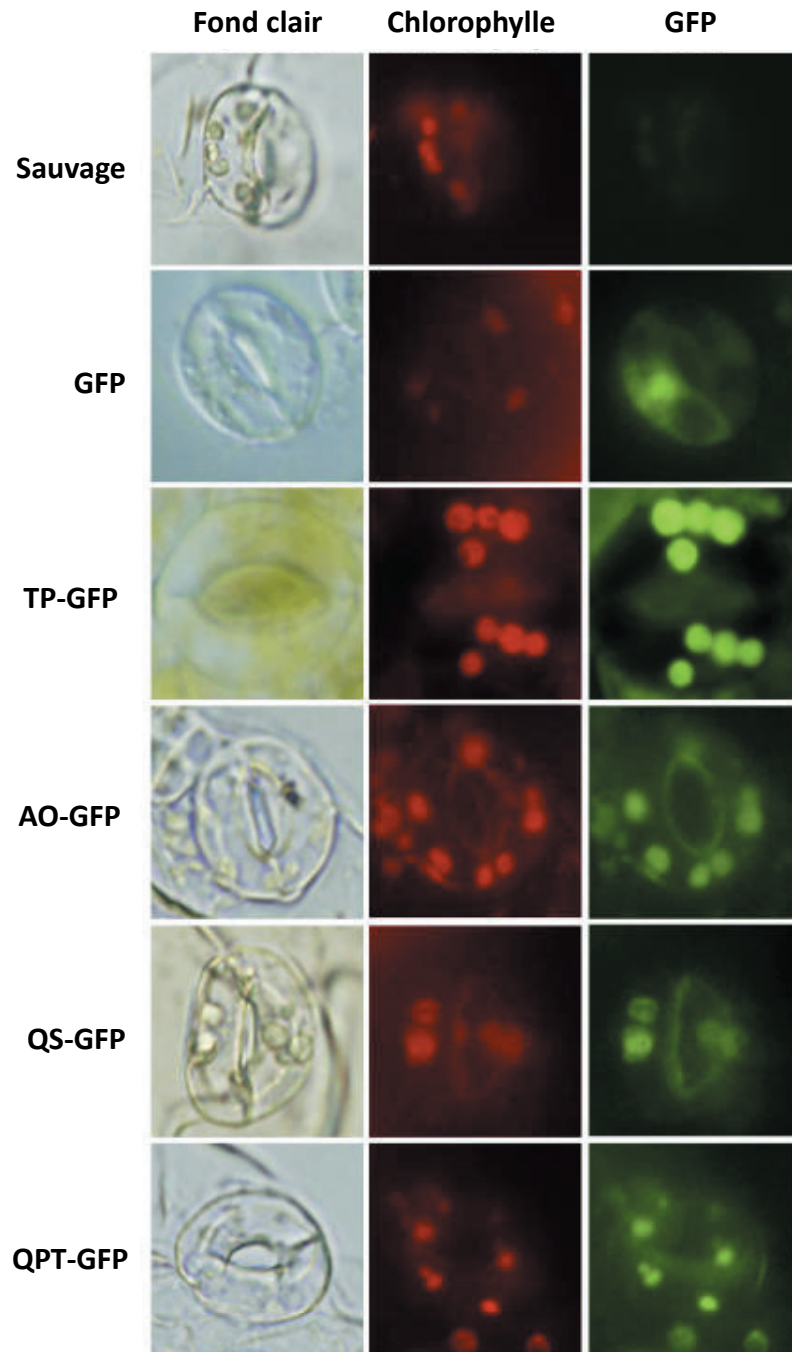
La voie des kynurénines n'intervient pas seulement dans la synthèse de quinolinate. Il semblerait que cette voie métabolique soit également impliquée dans divers processus biologiques. A titre d'exemple, des altérations des niveaux cérébraux de sérotonine entraînent chez l'Homme des troubles du comportement et la disponibilité en Trp pour la synthèse de sérotonine apparaît comme dépendante du niveau de la TDO hépatique (Comings *et al.*, 1995). En outre, des teneurs anormalement élevées en 3-hydroxykynurénine et en quinolinate ont été mesurées chez des patients atteints du SIDA ou de la maladie de Huntington (Guidetti *et al.*, 2004 ; Houtkooper *et al.*, 2009). Pour mémoire, le quinolinate est aussi impliqué dans d'autres pathologies lourdes comme la rage (Cuevas *et al.*, 2010).

## 2. Synthèse du quinolinate à partir de l'aspartate

---

Chez les plantes et la plupart des bactéries, la synthèse de QA se fait en deux étapes enzymatiques à partir du L-Asp. Cet acide aminé est d'abord oxydé par l'aspartate oxydase (AO) en iminoaspartate (IA), un intermédiaire chimiquement très instable. La quinolinate synthase (QS) permet ensuite la condensation de l'IA avec un intermédiaire de la glycolyse, le dihydroxyacétone phosphate (DHAP), pour former du quinolinate (**Figure 6**). L'acide quinolinique est alors métabolisé en acide nicotinique mononucléotide (NaMN) par la quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT). Des études cytologiques utilisant une fusion gène d'intérêt-GFP (*green fluorescent protein*) ont montré que les trois premières enzymes





**Figure 7. Localisation chloroplastique des trois premières enzymes de la voie de biosynthèse du NAD chez *Arabidopsis thaliana*.** En rouge est représentée l'autofluorescence de la chlorophylle et en vert celle de la GFP (*green fluorescent protein*). Les protéines chimériques de fusion GFP avec l'AO, la QS et la QPT, ainsi qu'une protéine de contrôle d'adressage au plaste (TP-GFP) sont localisées dans le chloroplaste des cellules de gardes d'*Arabidopsis thaliana*. D'après [Katoh et al. \(2006\)](#).

de la voie *de novo* sont chloroplastiques (Katoh *et al.*, 2006) (**Figure 7**). Cette même étude suggère que les mutants *knock-out* d'*Arabidopsis thaliana* affectés au niveau de l'AO, de la QS ou de la QPT sont létaux à l'état embryonnaire.

### a) L'aspartate oxydase (AO)

---

Comme les trois premières enzymes de la voie *de novo*, l'AO (EC 1.4.3.16) est codée chez *Arabidopsis thaliana* par un seul gène (*At5g14760*) (Katoh *et al.*, 2006) et par le gène *nadB* chez *Escherichia coli*. Chez les bactéries, cette étape enzymatique est sujète à un rétrocontrôle négatif enzymatique par le NAD (Nasu *et al.*, 1982). L'AO est une flavoprotéine bien caractérisée pour les systèmes procaryotes et qui lie de façon non covalente le FAD (**Figure 6**). A la différence d'autres aminooxydases, l'AO ne métabolise que le L-Aspartate (Asp) (Nasu *et al.*, 1982). Par ailleurs, selon les conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose dans lesquelles se trouvent les bactéries, l'oxydation de l'Asp en IA nécessite de l'oxygène ou du fumarate comme accepteurs d'électrons (Nasu *et al.*, 1982). Chez les plantes, cette enzyme est très peu étudiée et peu de données sont disponibles. Toutefois, le site Genevestigator met à disposition des profils d'expression de gènes indiquant que l'AO est fortement induite par les stress biotiques et abiotiques (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp> ; Zimmermann *et al.*, 2004). Enfin, chez certaines bactéries où le gène *nadB* est absent, l'oxydation de l'Asp est catalysée par l'aspartate déshydrogénase qui utilise comme cofacteur le NAD ou le NADP (Sakuraba *et al.*, 2005).

### b) La quinolinate synthase (QS)

---

La quinolinate synthase (QS, EC 2.5.1.72) est une métalloprotéine à centre fer-soufre (Fe-S) (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2005 ; Cicchillo *et al.*, 2005 ; Rousset *et al.*, 2008), codée par le gène *At5g50210* chez *Arabidopsis thaliana* (Katoh *et al.*, 2006) et par *nadA* chez



*Escherichia coli*. La QS métabolise l'IA en présence du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) pour générer du quinolinate (**Figure 6**). Cette enzyme, qui a fait l'objet de la thèse de Carine Rousset (Rousset, 2009), possède un domaine Cystéine (Cys) désulfurase qui stimule la reconstruction du centre Fe-S nécessaire à l'activité de la QS (Rousset *et al.*, 2008). Chez *Arabidopsis thaliana*, la caractérisation du mutant *old5* (*onset of leaf death 5*) affecté au niveau de ce domaine Cys désulfurase n'indique pas d'activité QS diminuée, mais montre une chute de l'activité Cys désulfurase qui pourrait perturber la compétence catalytique de l'enzyme (Schippers *et al.*, 2008). Malgré cette lésion dans la voie *de novo*, les auteurs ont montré chez *old5* une augmentation des teneurs en nucléotides à pyridine, en corrélation avec une augmentation des activités des enzymes intervenant dans la voie de recyclage du NAD.

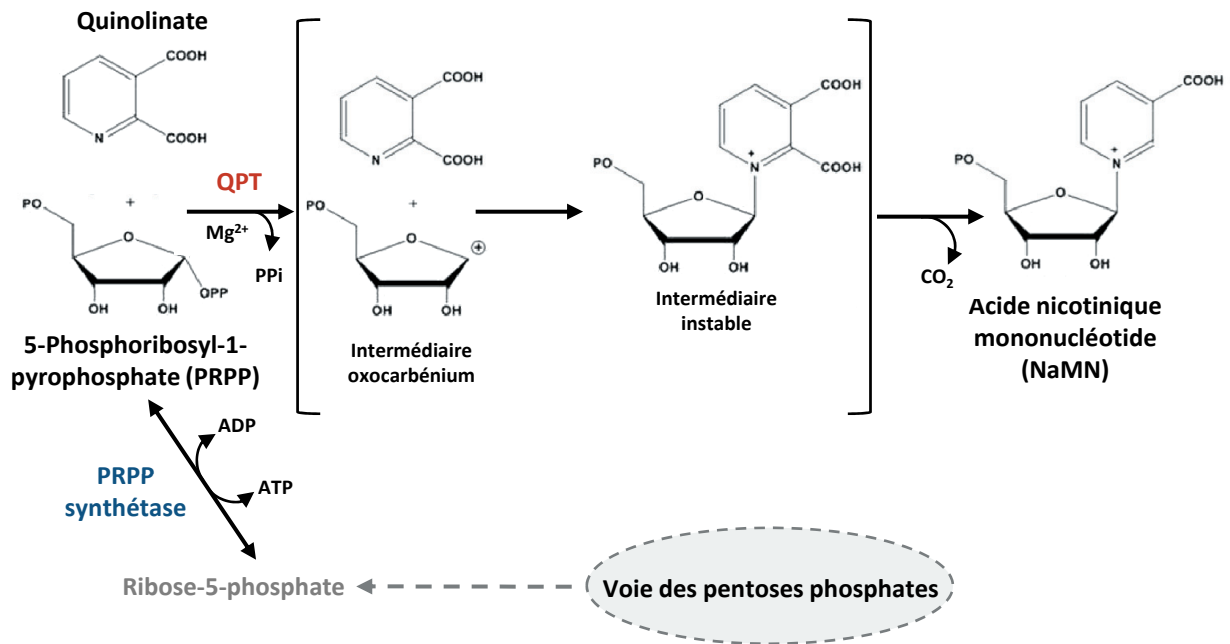
### 3. La quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT)

---

#### a) Réaction catalysée par la QPT

---

La quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT, EC 2.4.2.19) est commune aux voies de biosynthèse *de novo* à partir du Trp (Foster *et al.*, 1985) et de l'Asp (Bhatia et Calvo, 1996) (**Figure 4**). Le gène codant la QPT a été identifié chez un certain nombre de microorganismes comme *Escherichia coli* (Bhatia et Calvo, 1996), *Salmonella typhimurium* (Hughes *et al.*, 1993), la levure (Eads *et al.*, 1997) et également chez l'Homme (Fukuoka *et al.*, 1998). Le gène unique *At2g01350* d'*Arabidopsis thaliana* est l'homologue du gène bactérien *nadC* (Griffith *et al.*, 1975). La QPT appartient au groupe des phosphoribosyltransférases de type II qui catalysent la formation de liaisons N-nucléosides nécessaires à la production des nucléotides à purine, à pyrimidine et à pyridine. La synthèse de ces nucléotides nécessite une inversion stéréochimique au niveau du ribose anomérique C<sub>1</sub>. Ce processus fait intervenir un état transitoire avec production d'un intermédiaire réactionnel de type oxocarbénium au niveau C<sub>1</sub>-O<sub>4</sub> du ribose (Tao *et al.*, 1996 ; Rozenberg et Lee, 2008).



**Figure 8. La formation de l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN) à partir du quinolinate par la quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT).** Cette catalyse nécessite la présence d'ions  $Mg^{2+}$  et de 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP), avec libération de pyrophosphate (PPi) et de dioxyde de carbone ( $CO_2$ ). Au cours de la réaction, un intermédiaire oxocarbénium est formé et va réagir avec le quinolinate pour former un intermédiaire quinolinate mononucléotide instable. Une rapide décarboxylation produira ensuite l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN). Le PRPP est synthétisé par la PRPP synthétase à partir de ribose-5-phosphate provenant de la voie des pentoses phosphates. ADP : adénine diphosphate ; ATP : adénine triphosphate. D'après Liu *et al.* (2007).

La QPT catalyse la conversion du quinolinate en NaMN par transfert irréversible du groupement phosphoribosyle du 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) (**Figure 8**). Le PRPP est produit à partir du ribulose-5-phosphate issu de la voie des pentoses phosphates. Cette voie métabolique partage comme substrat avec la glycolyse le glucose-6-phosphate et génère, outre du ribulose-5-phosphate, du NADPH (**Figure 8**). La réaction catalysée par la QPT nécessite la présence d'ions bivalents  $Mg^{2+}$  et libère du pyrophosphate inorganique (PPi) et du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ). La purification et la caractérisation biochimique de la QPT humaine ont mis en évidence un mécanisme séquentiel ordonné en deux temps : d'abord un transfert du groupement phosphoribosyle suivi d'une décarboxylation (*Liu et al., 2007*). Le départ du groupement PPi du PRPP est activé par la coordination de  $Mg^{2+}$  conduisant à la formation d'un intermédiaire oxocarbénium. Cet intermédiaire réactionnel va réagir avec le quinolinate menant à la formation d'un composé instable, le quinolinate mononucléotide, qui va subir une décarboxylation rapide pour enfin donner du NaMN (*Liu et al., 2007*). Chez l'Homme, la résolution de la structure 3D de la protéine a permis de mettre en évidence une structure de type tunnel  $\alpha/\beta$  proche de la structure rencontrée chez l'enzyme bactérienne. Le site actif de la QPT humaine est localisé dans une structure de type "sandwich ouvert"  $\alpha/\beta$ , servant de réceptacle au tunnel  $\alpha/\beta$  de la sous-unité adjacente avec un site de liaison au QA de trois résidus arginine (R102, R138 et R161) et deux résidus lysine (K139 et K171). Une mutation au niveau de ces résidus affecte la liaison au substrat ou diminue l'activité de l'enzyme. Contrairement aux données obtenues chez les bactéries, le PRPP apparaît comme inhibiteur compétitif et non compétitif de la QPT humaine qui adopte également une structure hexamérique, plaçant ainsi les sites actifs à proximité les uns des autres (*Liu et al., 2007*). D'autres données enzymologiques indiquent que la QPT chez l'Homme ne peut utiliser le nicotinate pour la synthèse de NaMN, réaction catalysée par la nicotinate phosphoribosyltransférase (NaPT, EC 2.4.2.11). Egalement, des souches bactériennes mutées au niveau de la QPT (NadC) ou de la NaPT (PncB), présentent une auxotrophie qui n'est pas rétablie par le NA ou le QA, respectivement (*Foster et Moat, 1978 ; 1980*). Néanmoins, cette spécificité de substrat pour ces deux phosphoribosyltransférases n'a jamais été vérifiée chez les plantes. La production et la caractérisation de ces enzymes chez *Arabidopsis thaliana* permettraient de lever le doute sur cette interrogation.



Il est important d'ajouter que sous certaines conditions supraphysiologiques (pH faible et haute température) et sans catalyse enzymatique, le quinolinate peut être décarboxylé en nicotinate (NA), proche structuralement du QA (Dunn *et al.*, 1972). On pense notamment que cette décarboxylation se produit chez les Mammifères lors de la dégradation des pyrimidines, molécules proches des pyridines (Moudgil et Sadasivudu, 2004). La QPT elle-même pourrait décarboxyler le QA avant transfert du phosphoribosyle (Rozenberg et Lee, 2008).

### b) Distribution tissulaire de l'enzyme, et constantes cinétiques

---

Chez l'Homme et le rat, la distribution de l'activité QPT se limite à certains tissus (foie et rein) alors que les transcrits spécifiques à cette enzyme se retrouvent de façon ubiquiste (Shibata *et al.* 1986 ; 1991 ; Fukuoka *et al.* 1998 ; Ishidoh *et al.* 2010 ; profils d'expression UniGene Hs. 513484). Chez *Nicotiana rustica* et *Nicotiana tabacum*, une analyse des ADNc (acides désoxyribonucléiques complémentaires) de la QPT suggère la présence d'une séquence d'adressage à la mitochondrie (Sinclair *et al.*, 2000). En revanche, des études cytologiques ont montré chez *Arabidopsis thaliana* une localisation chloroplastique de l'enzyme (Katoh *et al.*, 2006). De même, la recherche de séquence d'adressage confirme la présence d'un peptide de transit et une analyse d'homologie de séquence indique des domaines hautement conservés chez les différents organismes (Noctor *et al.*, 2006). La structure tridimensionnelle de la QPT a été élucidée chez de nombreux organismes tels que *Salmonella* (Eads *et al.*, 1997), *M. tuberculosis* (Sharma *et al.*, 1998) et récemment chez l'Homme (Liu *et al.*, 2007 ; Kang *et al.*, 2011). Enfin, des analyses approfondies du rôle des résidus cationiques dans le site de liaison au QA révèlent l'importance d'autres résidus spécifiques chez l'Homme et *Salmonella typhimurium* (Liu *et al.*, 2007 ; Bello et Grubmeyer, 2010).

La QPT extraite de plantules étiolées de ricin (*Ricinus communis*) se présente sous forme d'un dimère de 70 kDa chacun et son activité est légèrement inhibée par le NAD (19 % à 1 mM) mais pas par d'autres nucléotides à pyridine (Mann et Byerrum, 1974). L'effet de



Composé	Structure	Pourcentage de contrôle	
		$10^{-3}M$	$10^{-2}M$
3-Amidopyridine-2-carboxylate		39	5
Methyl 3-amidopyridine-2-carboxylate		86	43
3-Cyanopyridine-2-carboxylate		52	22
Methyl 3-cyanopyridine-2-carboxylate		95	85
Methyl 3-carboxypyridine-2-carboxylate		69	30
4-Hydroxyquinolinic Acid		48	12
Picolinic Acid		20	8
2-Hydroxynicotinic Acid		78	50
2,5-Pyridinedicarboxylic Acid		100	90
2,4-Pyridinedicarboxylic Acid		88	73
3,4-Pyridinedicarboxylic Acid		61	20
2,6-Pyridinedicarboxylic Acid		43	6

**Figure 9. Effet de certains analogues du quinolinate sur l'activité QPT chez le ricin (*Ricinus communis L.*).** Différents analogues du quinolinate ont été testés sur l'activité *in vitro* QPT. La réaction a été suivie pendant 15 minutes à 30 °C en présence de 37.5  $\mu M$  de quinolinate et 62.5  $\mu M$  de PRPP. D'après Mann et Byerrum (1974).

différents analogues du quinolinate a également été investigué. Aucune inhibition de l'activité QPT n'a été observée en présence d'analogues du QA dépourvus de carboxyle en C<sub>2</sub> et avec un carboxyle, un carboxylamide ou un groupement cyanure en position 3 (**Figure 9**). Ces observations indiquent que le nicotinate, le nicotinamide et le nicotinonitrile ne répriment pas l'activité QPT (Mann et Byerrum, 1974). Par contre, en ajoutant un carboxyle en position 2 aux composés cités ci-dessus, les molécules résultantes provoquent une inhibition de la réaction et l'acide picolinique (2-carboxypyridine) semble être un puissant inhibiteur (Mann et Byerrum, 1974). Cette inhibition par les composés 2-carboxylés pourrait être levée par génération de dérivés 2-méthylester. De ce fait, le groupement carboxyle en position 2 serait également important pour la liaison du substrat au site actif de l'enzyme. En outre, le 2-hydroxynicotinate inhibe la QPT dans une certaine mesure (50 % d'inhibition à 10 mM) mais de façon moins efficace que les composés 2-carboxylés. Le 2-méthylester quinolinate inhibe plus efficacement l'enzyme que le méthyl-3-cyanopyridine-2-carboxylate ou le méthyl-3-amidopyridine-2-carboxylate, témoignant également d'une spécificité pour le groupement en position 3 (Mann et Byerrum, 1974). En d'autres termes, les groupements en position 2 et 3 sont nécessaires à la liaison du quinolinate à la QPT. D'autres données biochimiques chez le tabac indiquent un  $K_m$  de l'enzyme pour le QA de l'ordre de 5.1  $\mu\text{M}$  et 21  $\mu\text{M}$  pour le PRPP (Wagner et Wagner, 1984). Chez le ricin, les  $K_m$  sont de 12  $\mu\text{M}$  pour le QA et 45  $\mu\text{M}$  pour le PRPP (Mann et Byerrum, 1974).

### *c) Une enzyme clé dans la voie métabolique du NAD*

---

Bien que les mécanismes régulateurs de la synthèse du NAD restent méconnus chez les plantes, plusieurs données suggèrent que la QPT exerce un contrôle majeur dans la production du NAD et de ses dérivés chez les végétaux. Chez le tabac, des données moléculaires et biochimiques indiquent que la QPT permettrait de maintenir la fourniture en acide nicotinique nécessaire à la synthèse des dérivés à cycle pyridine comme les alcaloïdes de défense à pyridine (putrescine, anabasine, nicotine) (Mann et Byerrum, 1974 ; Feth *et al.*, 1986 ; Wagner *et al.* 1986a ; Sinclair *et al.*, 2000). Les autres enzymes intervenant dans ce métabolisme présentent des coefficients régulateurs moindres (Wagner et Wagner, 1985 ;



Wagner *et al.*, 1986a ; 1986b). Chez *Nicotiana tabacum*, entre 24 à 48 h après blessures foliaires, l'activité QPT augmente drastiquement dans les racines (Saunders et Bush, 1979) et s'accompagne d'une production de nicotine *in planta* mais également *in vitro* dans des cultures tissulaires de cals (Wagner *et al.*, 1986a ; Feth *et al.*, 1986). Ainsi, non seulement la QPT est une enzyme clé pour le métabolisme primaire, en catalysant le point d'entrée du cycle des nucléotides à pyridine avec le nicotinate comme intermédiaire (**Figure 4**), mais également pour le métabolisme dit secondaire avec le nicotinate comme précurseur de la synthèse d'alcaloïdes.

Très récemment, la QPT a été identifiée comme protéine de liaison à la caspase-3, sans être le substrat de celle-ci (Ishidoh *et al.*, 2010). Les caspases sont des protéines intervenant dans les phénomènes d'apoptose (ou mort cellulaire programmée) (Boatright et Salvesen, 2003). La caspase-3 est particulièrement importante dans le contexte de mort cellulaire où elle apparaît comme essentielle pour la fragmentation de l'ADN et pour les changements morphologiques du noyau, alors que son activation est cytosolique (Woo *et al.*, 1998). La caspase-3 n'induit pas seulement l'apoptose, elle limite aussi le processus de nécrose. En effet, en clivant la poly-ADPribose polymérase (PARP) PARP-1 (enzyme qui utilise le NAD<sup>+</sup>), la caspase-3 active limite la déplétion de l'ATP dans le noyau, phénomène conduisant à une nécrose (Berger *et al.*, 2004 ; Nicotera et Melino, 2004). Une diminution des niveaux cellulaires de QPT augmente l'activité caspase-3, entraînant une sensibilité exacerbée à la mort cellulaire spontanée. Ces données suggèrent *in fine* que la QPT limiterait la mort cellulaire spontanée en inhibant la surproduction de caspase-3 (Ishidoh *et al.*, 2010).

#### 4. Synthèse du NAD à partir du NaMN

---

Les étapes enzymatiques suivantes sont cytosoliques et communes aux voies de biosynthèse et de recyclage de molécules dérivées du NAD. Le NaMN est subséquentement adénylylé en acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD) par la nicotinate

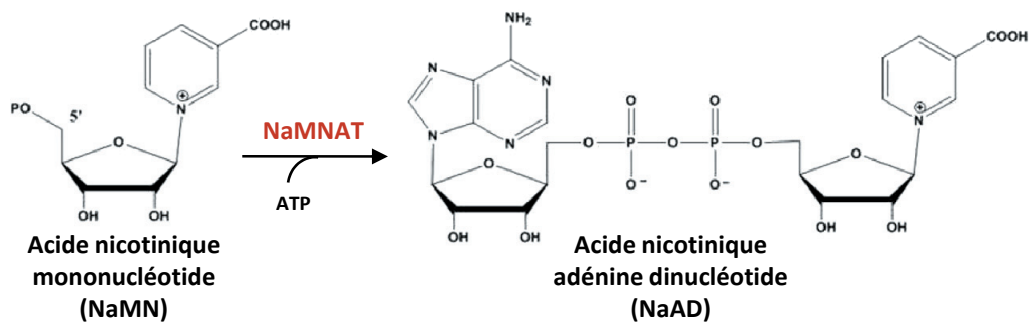


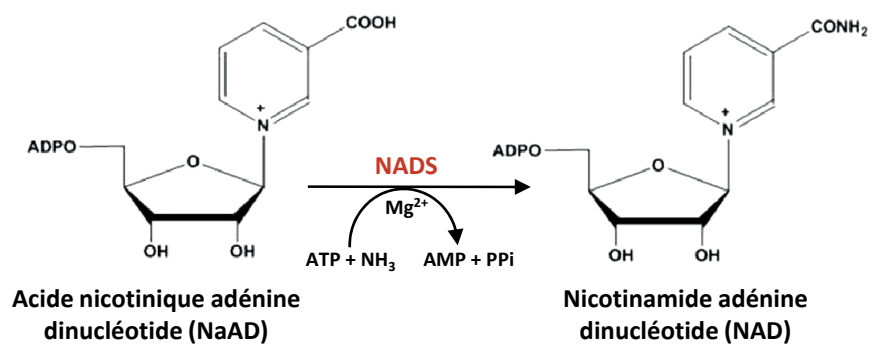
Figure 10. L'adénylylation de l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN) en acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD) par l'acide nicotinique mononucléotide adényltransférase (NaMNAT). Cette réaction nécessite de l'adénosine triphosphate (ATP).

mononucléotide adényl(yl)transférase (NaMNAT). La NAD synthétase (NADS) réalise l'étape finale d'amidation du NaAD en NAD (Ashihara *et al.*, 2005).

### a) L'acide nicotinique adényltransférase (NaMNAT)

---

Le NaMN synthétisé par la QPT sert de substrat à l'acide nicotinique adényltransférase (NaMNAT, EC 2.7.7.18) qui permet l'adénylylation de ce composé en acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD, ou déamido-NAD), avec hydrolyse de l'ATP (**Figure 10**). Au cours de cette réaction facilitée par la liaison de cations  $Mg^{2+}$ , le groupement 5' du NaMN subit une attaque nucléophile. Des études biochimiques menées chez *Escherichia coli* (Magni *et al.*, 1999) et chez l'Homme (Lau *et al.*, 2010) indiquent que la NaMNAT peut utiliser le NaMN et le nicotinamide mononucléotide (NMN) comme substrat. Elle porte alors le nom de NMNAT pour NMN (ou NaMN) adényltransférase. Toutefois, l'enzyme utilise préférentiellement le NaMN (préférence supérieure à 1000 fois, en comparant les valeurs de  $K_{cat}/K_m$  pour chacun des substrats) (Magni *et al.*, 2004). Dans les racines de tabac, l'adényltransférase présente également une activité spécifique pour le NaMN supérieure à celle pour le NMN (3.58 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> pour le NaMN contre 0.67 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> pour le NMN) (Wagner et Wagner, 1985), corroborant alors des travaux menés chez *Escherichia coli* et la levure (Dahmen *et al.*, 1967). Chez *Arabidopsis thaliana*, un gène unique (*At5g55810*) code la NaMNAT et le mutant homozygote *atnmnat* correspondant ne peut être isolé (Hashida *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent fortement que la NaMNAT, à l'instar de la QPT (Kato *et al.*, 2006), est indispensable à la biosynthèse du NAD. Par conséquent, si la voie métabolique du "NAM vers NAD" existe chez les plantes, l'étape enzymatique catalysée par la NaMNAT serait limitante, et cette enzyme serait à la fois impliquée dans la synthèse *de novo* et dans le recyclage du NAD à travers le métabolisme du NAM. Très récemment, une activité N(a)MNAT a été détectée dans des mitochondries de tubercules d'*Helianthus tuberosus* (Di Martino et Pallotta, 2011). Cette localisation nouvelle attribuée à l'enzyme N(a)MNAT joue certainement un rôle important dans le métabolisme du NAD mitochondrial. Toutefois, chez *Arabidopsis thaliana*, la



**Figure 11. L'amidation de l'acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD) en NAD par la NAD synthétase (NADS).** Cette réaction nécessite de l'ATP et un donneur de groupement  $\text{NH}_2$  comme la glutamine voire l'asparagine chez les plantes (Wagner et Wagner, 1985).

séquence protéique de l'enzyme codée par le gène *At5g55810* ne présente pas de peptide d'adressage mitochondrial présumé. Une localisation subcellulaire de l'enzyme d'*Arabidopsis thaliana* permettrait de clarifier cette incertitude.

### b) La NAD synthétase (NADS)

---

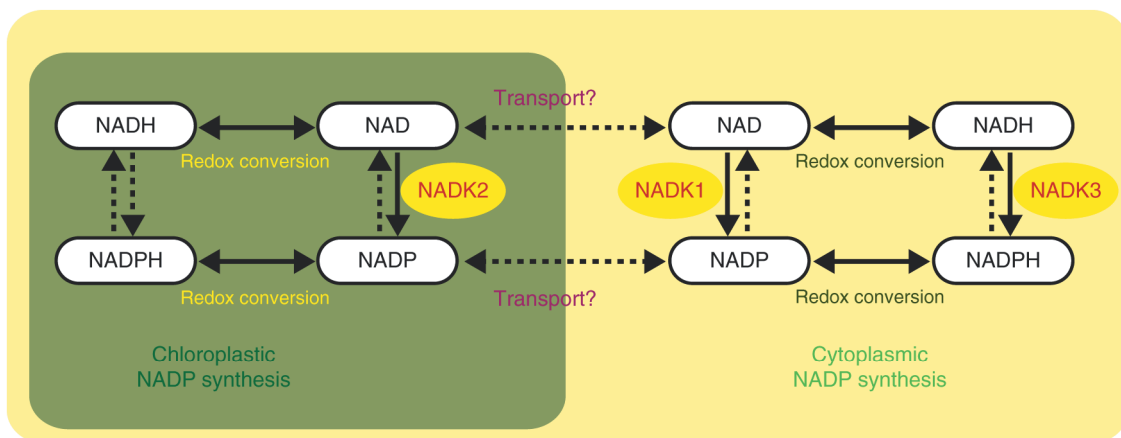
L'étape ultime de synthèse du NAD est une amidation du NaAD en NAD, réaction catalysée par la NAD synthétase (NADS, EC 6.3.5.1), codée par le gène *nadE* chez les bactéries et le gène *At1g55090* chez *Arabidopsis thaliana* (**Figure 11**). La fonction acide du NaAD est transformée en fonction amide, en présence d'ions  $Mg^{2+}$  qui permettent d'activer le groupement phosphate de l'ATP, de stabiliser le groupement partant  $PPi$  et de faciliter l'attaque de l'ammoniac ( $NH_3$ ) (Ozment *et al.*, 1999). Cette réaction nécessite donc un donneur de  $NH_2$ . La NADS d'*Escherichia coli* accepte uniquement le  $NH_3$  comme donneur ( $K_m$  pour le  $NH_4Cl$  de 65  $\mu M$ ) (Spencer et Preiss, 1967), alors que chez la levure et le rat l'enzyme accepte le  $NH_4Cl$  ( $K_m = 140$  mM) et la glutamine ( $K_m = 35$  mM), même si la glutamine (Gln) serait le substrat physiologique (Preiss et Handler, 1958b). Chez le tabac, aucune synthèse de NAD n'est détectée lorsque la réaction est réalisée en présence de  $NH_4^+$  (Wagner et Wagner, 1985). L'enzyme de plante accepte préférentiellement la Gln et un autre acide aminé : l'asparagine (Asn). De ce fait, selon les concentrations cellulaires en acides aminés, la Gln ou l'Asn sont des substrats potentiels à concentrations physiologiques (3 mM) (Wagner et Wagner, 1985).

### B. Formation du NADP : les NAD kinases

---

Le NAD peut être phosphorylé par les NAD kinases (NADK, EC 2.7.1.23) en NADP (Hunt *et al.*, 2004) (**Figure 2**). Les gènes codant ces enzymes ont été clonés pour de nombreux organismes (Pollak *et al.*, 2007). Chez l'Homme et plusieurs bactéries, un seul





**Figure 12. La compartimentation cellulaire des NAD kinases (NADK) chez les plantes.** L'isoforme NADK1 est cytosolique et NADK3 est vraisemblablement péroxysomale (Waller *et al.*, 2010), alors que NADK2 est retrouvée dans les chloroplastes. Les pointillés indiquent des processus non confirmés expérimentalement. D'après Hashida *et al.* (2009).

gène est retrouvé (Kawai et Murata, 2008) et des activités NADK ont été détectées dans le cytosol et d'autres compartiments subcellulaires de la levure et des plantes (Jarrett *et al.*, 1982 ; Simon *et al.*, 1982 ; 1984 ; Dieter et Marmé, 1984 ; Iwahashi et Nakamura, 1989 ; Iwahashi *et al.*, 1989). Trois gènes différents ont été clonés chez *Arabidopsis thaliana* (Turner *et al.*, 2004 ; 2005). NADK2 (codée par *At1g21640*) est localisée dans le stroma du chloroplaste et l'isoforme NADK1 (*At3g21070*) est retrouvée dans le cytosol (Chai *et al.*, 2005 ; Waller *et al.*, 2010). Une récente étude montre que NADK3 (*At1g78590*) se situe dans la matrice du péroxysome (Waller *et al.*, 2010), alors que des travaux antérieurs indiquaient une localisation cytosolique pour cette enzyme (Chai *et al.*, 2006) (**Figure 12**). Chez la levure il existe trois isoformes des NADKs, l'une localisée dans la mitochondrie (Outten et Culotta, 2003), les deux autres étant cytosoliques (Kawai *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, NADK1 et NADK2 sont NAD<sup>+</sup> spécifiques (Turner *et al.*, 2004 ; 2005) et NADK3 montre une très nette préférence pour le NADH ( $K_m$  pour le NADH 60 fois plus bas que celui pour le NAD<sup>+</sup> (Turner *et al.*, 2005). Chez les plantes, le NADP mitochondrial pourrait être en partie importé depuis le pool cytosolique (Bykova et Møller, 2001). Ainsi, si NADK3 est une isoforme cytosolique, son activité *in planta* avec le NAD<sup>+</sup> ne peut être totalement rejetée au regard du ratio NAD<sup>+</sup>/NADH très élevé dans le cytosol (entre 10 et 30, Igamberdiev et Gardeström, 2003).

Historiquement, les NADKs ont été étudiées comme outil pour investiguer les calmodulines (CaM) qui sont des protéines ubiquitaires capables de s'associer aux ions calcium (Ca<sup>2+</sup>) du milieu intracellulaire et activées par les NADKs (Roberts et Harmon, 1992). Chez de nombreuses espèces, les NADKs diffèrent suivant leur dépendance aux CaM (Allan et Trewavas, 1985 ; Gallais *et al.*, 2000). Une situation similaire est rencontrée chez les végétaux, avec des isoformes dépendantes ou indépendantes des CaM. Par exemple, l'épinard présente une isoforme cytosolique dépendante aux Ca<sup>2+</sup>/CaM alors qu'une isoforme chloroplastique est indépendante. Chez l'avoine, deux NADKs CaM-dépendantes ont été décrites, l'une mitochondriale et l'autre cytosolique. Une troisième isoforme possède une activité non liée aux CaM (Gallais *et al.*, 2000). Chez le microorganisme *Euglena gracilis*, deux isoformes solubles sont à la fois dépendantes et indépendantes des CaM (Stephan *et al.*, 2000). Enfin, chez le maïs, une NAD kinase activée par CaM est localisée au



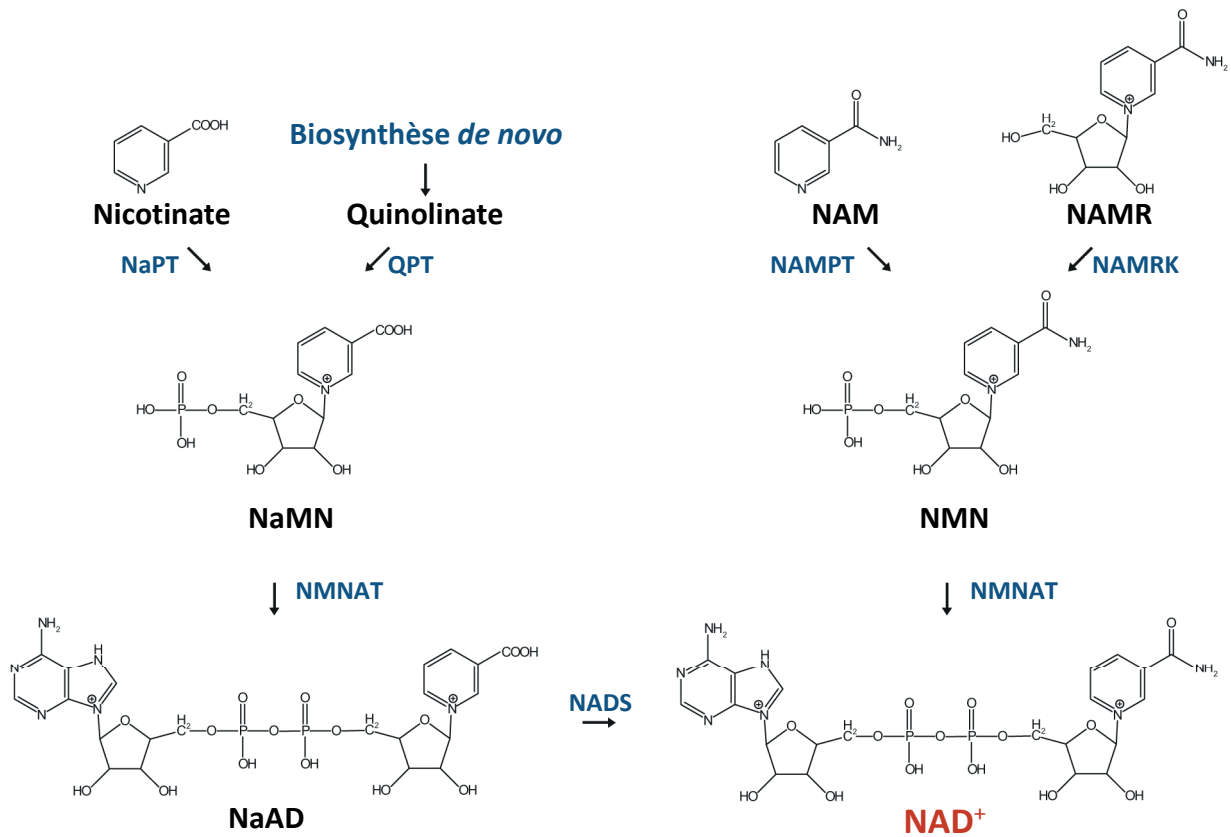
niveau de la membrane externe de la mitochondrie et permettrait une réponse aux changements cytosoliques des niveaux calciques (Dieter et Marmé, 1984).

Outre le transfert d'un phosphate de l'ATP vers le NAD pour former du NADP, les NADKs peuvent aussi utiliser le NaAD comme substrat et alors synthétiser du NaADP (Aarhus *et al.*, 1995 ; Lerner *et al.*, 2001 ; Chini *et al.*, 2002). L'accès récent à la structure de la NAD kinase humaine montre que cette enzyme est incapable de phosphoryler le NaAD chez l'Homme (Lerner *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, il semblerait également que la majorité du NADP(H) synthétisé dans les organes photosynthétiques provienne de la NADK2, en regard de l'activité NADK et du NADP(H) qui diminuent fortement dans les feuilles du mutant *knock-out nadk2* (Chai *et al.*, 2005 ; Takahashi *et al.*, 2009). Notons que le NADPH peut être aussi généré à partir du NADP<sup>+</sup> par la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons et dans les tissus non-photosynthétiques à partir du NADP<sup>+</sup> par la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase *via* la voie des pentoses phosphates (Corpas *et al.*, 1998).

### III. Recyclage du NAD et de ses dérivés

---

Il existe une grande diversité de voies de recyclage des nucléotides à pyridine selon les organismes et pour tout système biologique considéré, ces voies permettent de régénérer le pool de NAD, notamment lorsque la voie de biosynthèse *de novo* est non fonctionnelle. Ce recyclage est lié au métabolisme du nicotinamide et fait intervenir chez les plantes deux étapes enzymatiques catalysées par les nicotinamidases puis les nicotinate phosphoribosyltransférases (NaPT) (Kato *et al.*, 2006; Wang et Pichersky, 2007). Les Animaux possèdent quant à eux une voie de secours différente avec d'autres enzymes mises en jeu. Un recyclage utilisant les pyridines nucléosides existe aussi chez certains organismes, et notamment chez les plantes.



**Figure 13. La voie de recyclage du NAD chez les Mammifères.** Le recyclage du NAD<sup>+</sup> se fait à partir du nicotinate, du nicotinamide (NAM) ou du NAM riboside (NAMR). Chez les animaux, la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT) peut directement métaboliser le NAM en NAM mononucléotide (NMN), également produit par phosphorylation du NAMR par la NAMR kinase (NAMRK). La conversion du NaMN et du NMN est réalisée par la même enzyme, la NMNAT ou N(a)MN adényltransférase. Dans le cas du NaMN, la réaction est suivie d'une amidation en NAD<sup>+</sup> par la NAD synthase (NADS). D'après [Houtkooper et al. \(2009\)](#).

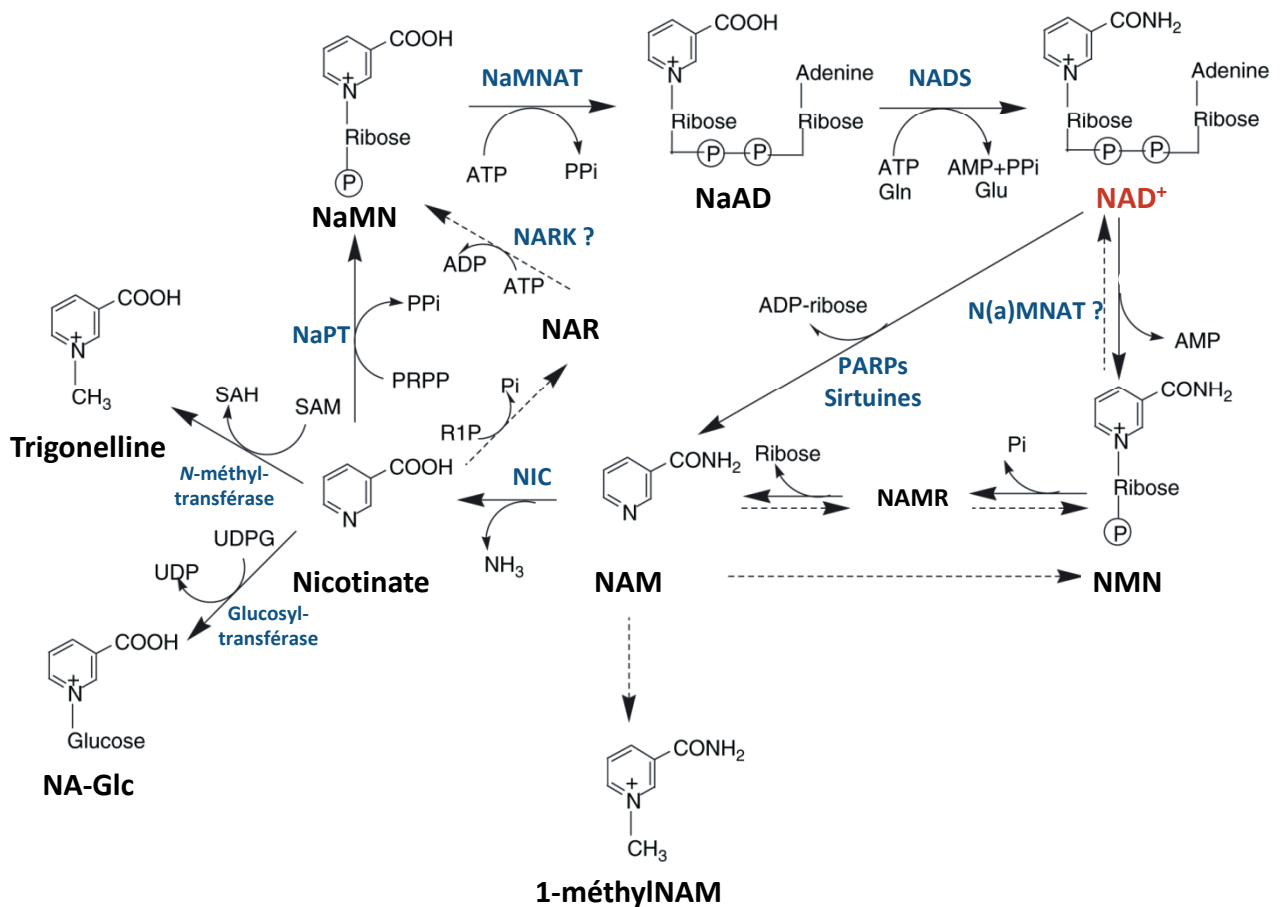
## A. Recyclage des nucléotides à pyridine

---

### 1. Du NAD au nicotinate : le métabolisme du nicotinamide

---

Au cours de nombreux processus cellulaires (détaillés dans la section catabolisme du NAD), le  $\text{NAD}^+$  est dégradé en nicotinamide (NAM) ou nicotinamide mononucléotide (NMN) (Berger *et al.*, 2004). Chez les Animaux, ce catabolisme fait intervenir différentes enzymes comme les NAD glycohydrolases (EC 3.2.2.25) et les Nudix hydrolases (NUDX, EC 3.2.2.5) (McLennan, 2006 ; Hashida *et al.*, 2009). De plus, le NAM fourni par l'alimentation constitue un précurseur de la vitamine B3 essentielle à la production d'énergie à partir des glucides, lipides et protéines. Une régulation fine des niveaux intracellulaires de NAM à travers sa synthèse et son recyclage en NMN permettrait de maintenir l'homéostasie du NAD(P) (Ashihara *et al.*, 2005). Dans la voie de recyclage, le NAM est recyclé en NAD par deux enzymes (**Figure 13**). Dans un premier temps, le NAM est directement transformé en NMN par la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT, EC 2.4.2.12) (Revollo *et al.*, 2004) (Sonoli *et al.*, 2011). Cette enzyme est aussi connue sous le nom de visfatine (Sonoli *et al.*, 2011) mais aucune preuve de son activité n'a été apportée chez les plantes (Zheng *et al.*, 2005). Elle possède un  $K_m$  pour le NAM de  $0.92 \mu\text{M}$  et une  $V_{\text{max}}$  de  $21 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  (valeurs déterminées pour l'enzyme recombinante de souris, Revollo *et al.*, 2004). Pour le PRPP, un  $K_m$  de  $357 \mu\text{M}$  a été mesuré pour le foie de rat (Dietrich *et al.*, 1966). Dans un second temps, le NMN est adénylé en NAD par la nicotinamide mononucléotide adényltransférase (NMNAT), enzyme bifonctionnelle importante chez les Mammifères puisqu'elle catalyse l'adénylylation du NaMN en NaAD mais aussi du NMN en NAD (Raffaelli *et al.*, 2002 ; Zheng *et al.*, 2005) (**Figure 13**). Le NAM était considéré comme le précurseur majeur à la voie de recyclage pour maintenir le pool de NAD (Rongvaux *et al.*, 2003). Cette hypothèse est dorénavant mise en doute puisqu'un apport en NAM chez les Animaux n'augmentent pas efficacement les teneurs intracellulaires en NAD (Revollo *et al.*, 2004).



**Figure 14. Le recyclage du NAD et le métabolisme du nicotinamide (NAM) chez les végétaux.** Le recyclage du NAD<sup>+</sup> est réalisé à partir du nicotinate, du nicotinamide (NAM) et probablement du NAM riboside (NAMR). Aucune nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT) n'a été identifiée chez les plantes. En revanche, des intermédiaires métaboliques sont détectés chez plusieurs espèces. Le NAM mononucléotide (NMN) est synthétisé par phosphorylation du NAMR par la NAMR kinase (NAMRK). La conversion du NaMN et du NMN est vraisemblablement réalisée par la même enzyme, la NMNAT ou NaMN/NMN adényltransférase. Dans le cas du NaMN, la réaction est suivie d'une amidation en NAD<sup>+</sup> par la NAD synthétase (NADS). Les pointillés indiquent des réactions possibles mais non établies expérimentalement. Gln : glutamine ; Glu : glutamate ; UDP : uridine diphosphate ; NA-Glc : Na glucoside ; NAR : nicotinate riboside ; NARK : NAR kinase ; UDPG : UDP glucose ; R1P, Ribose-1-phosphate ; SAH, S-adenosyl-homocystéine ; SAM, S-adenosyl-méthionine. Il semblerait que la réaction catalysée par la NaPT soit réversible (ce qui n'est pas indiqué sur le schéma). D'après Matsui *et al.* (2007).

Chez les plantes, le métabolisme du NAM diffère sensiblement (Noctor *et al.*, 2006 ; Matsui *et al.*, 2007 ; Ashihara *et al.*, 2010) (Figure 14). Le NAM est hydrolysé en NA par les nicotinamidases, enzymes absentes chez les Animaux (Chappie *et al.*, 2005). Chez les Mammifères, le NA doit être apporté de façon exogène (Rongvaux *et al.*, 2003), notamment sous forme de niacine par l'alimentation ou en complément nutritif.

### a) Les nicotinamidases

---

Les nicotinamidases (NIC, EC.3.5.1.19) hydrolysent le NAM en NA avec production de  $\text{NH}_3$  (Figure 14). Chez *Arabidopsis thaliana*, quatre gènes putatifs (*At2g22570*, *At5g23220*, *At5g23230* et *At3g16190*) codent pour des NIC d'après une recherche par blast d'homologie nucléotidique avec le gène de levure NIC (*PNC1*) (Wang et Pichersky, 2007). En revanche, seules les enzymes codées par les gènes *At2g22570*, *At5g23220* et *At5g23230* présentent réellement des activités NIC. AtNIC1 est codée par le gène *At2g22570*. Une caractérisation enzymatique a permis de déterminer un  $K_m$  apparent de 118  $\mu\text{M}$  pour le NAM et une valeur de  $K_{\text{cat}}$  de 0.93  $\text{sec}^{-1}$ . L'activité de AtNIC1 est fortement inhibée par 5 mM d'ions  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ , alors que  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  jouent un rôle d'activateur réactionnel (Wang et Pichersky, 2007).

Chez les bactéries, l'hydrolyse du NAM en NA est également catalysée par une nicotinamidase qui porte le nom de PncA (*pyridine nucleotide cycling A*) (Frothingham *et al.*, 1996). Le mécanisme réactionnel de cette enzyme a été révélé chez *Pyrococcus horikoshii* (Du *et al.*, 2001). Une triade catalytique Cystéine-Lysine-Aspartate (découverte chez d'autres amidases) interagit avec un cation  $\text{Zn}^{2+}$  qui agirait comme un acide de Lewis. Ceci permet le transfert d'un proton et l'activation du thiolate de la cystéine du site actif de la PncA, nécessaires à l'attaque nucléophile sur le nicotinamide conduisant à la libération de  $\text{NH}_3$  et à la production de NA (Du *et al.*, 2001).





b) *Métabolisme du nicotinate vers le NaMN et d'autres composés secondaires*

---

Le NA est phosphoribosylé par les nicotinate phosphoribosyltransférases (NaPT, EC 2.4.2.11) en NaMN qui servira à son tour à la production de NAD par la voie *de novo* (**Figure 14**). Chez les Mammifères, un apport alimentaire en NA sous forme de niacine est indispensable au recyclage du NA en NaMN par la NaPT (Brenner, 2005 ; Revollo *et al.*, 2004 ; Sestini *et al.*, 2000). Contrairement au NAM, le NA est un meilleur précurseur pour synthétiser du NAD dans certains tissus comme le foie, le rein, le cœur ou l'intestin (Collins *et al.*, 1972 ; Lin *et al.*, 1972 ; Willimas *et al.*, 1985 ; Jackson *et al.*, 1995). L'augmentation en NAD dans certains tissus en réponse à l'apport de NA est corrélée à une activité NaPT accrue, suggérant ainsi un rôle important pour cette enzyme dans la production de nucléotides à pyridine (Shibata *et al.*, 1991).

c) *Les nicotinate phosphoribosyltransférases (NaPTs)*

---

Comme la QPT, la NaPT est une phosphoribosyltransférase de type II. Elle catalyse le transfert du phosphoribosyle du PRPP sur le NA pour former du NaMN, sans étape de décarboxylation (**Figure 14**). Cette réaction est potentiellement réversible même si son équilibre est presque entièrement déplacé en faveur de la synthèse de NaMN (Gross *et al.*, 1996). Notons que chez plusieurs bactéries, le gène *pncB* codant la NaPT est colocalisé sur le même opéron que le gène *pncA* codant la nicotinamidase (Osterman *et al.*, 2007). *Arabidopsis thaliana* possède deux NaPTs: NaPT1 codée par le gène *At4g36940* et NaPT2 codée par le gène *At2g23420*. Bien qu'aucune étude cytotologique n'ait été effectuée pour les NaPTs de plantes, les isoformes sont vraisemblablement cytosoliques puisque l'analyse de prédiction de séquence d'adressage n'identifie pas clairement de peptide de transit chloroplastique ou mitochondrial (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> ;



<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>;<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>).

Chez l'Homme, alors que la NAMPT est inhibée par le NAD, de fortes augmentations en NAD NaPT-dépendantes peuvent s'expliquer en partie par une absence de rétrocontrôle négatif du NAD sur la NaPT (Hara *et al.*, 2007). Plusieurs constantes cinétiques ont été déterminées dans des systèmes Animaux : une valeur de  $K_m$  de 13  $\mu\text{M}$  pour le NA et 2  $\mu\text{M}$  pour le PRPP dans le foie porcin (Hayakawa *et al.*, 1984) et une  $V_{\max}$  de 53  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  pour la NaPT d'érythrocytes humains (Niedel *et al.*, 1973). L'enzyme humaine est incapable de produire du NaMN à partir du quinolinate (Hara *et al.*, 2007). Cette spécificité de substrat n'a jamais été investiguée chez les végétaux.

#### d) Vers la production d'alcaloïdes à pyridine

---

Chez de nombreuses plantes, il existe un lien étroit entre le métabolisme du NAD et la synthèse d'alcaloïdes à pyridine, souvent accentuée lors d'un stress, notamment après blessure foliaire. Nombre de données obtenues chez les plantes sur le métabolisme du NAD proviennent initialement d'études menées sur la production d'alcaloïdes à pyridine, et non pas sur la synthèse de NAD *stricto sensu* (Waller *et al.*, 1966 ; Frost *et al.*, 1967 ; Mann et Byerrum, 1974 ; Wagner *et al.*, 1986b ; Sinclair *et al.*, 2000 ; Cane *et al.*, 2004 ; Zheng *et al.*, 2004 ; 2005). Le NA, NAM, QA, NaAD, et NAD fournis de façon exogène sont autant de sources efficaces à la synthèse de nicotine et de ricinine (Waller *et al.*, 1966 ; Frost *et al.*, 1967 ; Katoh et Hashimoto, 2004 ; Zheng *et al.*, 2005). Les auteurs ont aussi observé que le QA et le NAM étaient aussi efficaces que le NA à la biosynthèse de NAD, ce qui laisse penser que le recyclage des nucléotides à pyridine bénéficie d'un *turnover* rapide sous certaines conditions.



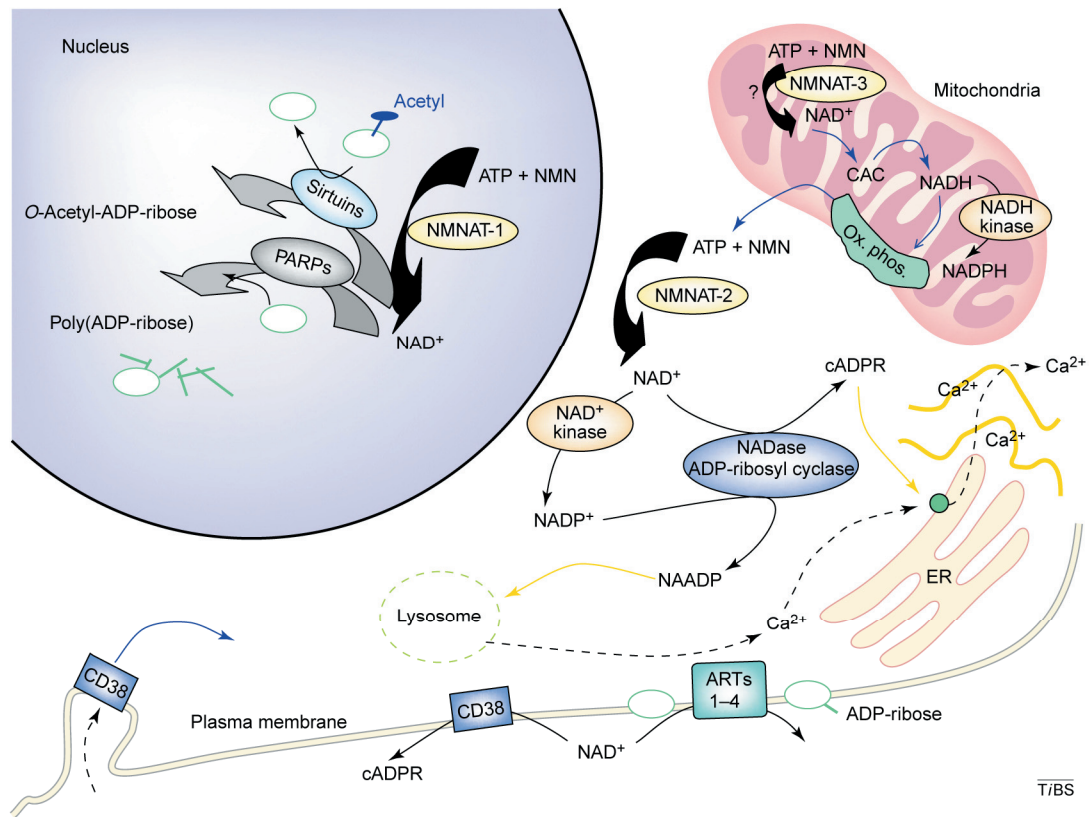
Des expériences complémentaires de marquage radioactif du NAM chez certaines espèces dont *Arabidopsis thaliana* (Matsui *et al.*, 2007) indiquent que le NAM est non seulement utilisé pour la synthèse du NAD après conversion en NA, mais est également incorporé en alcaloïde à pyridine ubiquitaire comme la trigonelline (acide 1-N-méthylnicotinique, abondant chez les légumineuses) par les N-méthyltransférases (EC 2.1.1.7) ou en d'autres conjugués tels que le nicotinate-1N-glucoside (Na-Glc) (**Figure 14**). Cette synthèse de trigonelline est plus importante dans les feuilles que dans les racines (Matsui *et al.*, 2007). Le NA-Glc quant à lui est le principal conjugué du NA formé chez *Arabidopsis thaliana* et dans les cultures cellulaires de tabac BY-2.

### B. Recyclage des pyridines nucléosides

---

En complément de la synthèse de pyridines mononucléotides (NMN et NaMN) par l'activité des phosphoribosyltransférases, une voie de recyclage alternative a été décrite pour plusieurs organismes (Bieganowski et Brenner, 2004). Cette voie implique la production de NMN par phosphorylation de NAM riboside (NAMR) (**Figure 13**). Bieganowski *et al.* (2004) ont mis en évidence un recyclage du NAMR par les NAMR kinases (NAMRK, EC 2.7.1.22) chez la levure et l'Homme. Chez ses organismes, à la fois le NAM et le NAMR sont recyclés. Les NAMR kinases appartiennent aux familles des désoxynucléoside kinases et nucléoside monophosphate kinases et une NAMRK chez l'Homme a été cristallisée afin d'obtenir sa structure 3D (Khan *et al.*, 2007).

Chez certains végétaux, il est possible de produire du NAMR à partir du NMN (Zheng *et al.*, 2005), mais aucune NAMR kinase n'a encore été découverte (**Figure 14**). Cette voie de secours alternative semblait alors évasive jusqu'à la découverte chez *Phaseolus* de l'activité nicotinate riboside kinase (NARK, EC.2.7.1.22) qui conduit à la formation de NaMN à partir de nicotinate riboside (NAR) (Matsui *et al.*, 2007). Une étude menée chez *Coffea arabica* démontrait déjà une incorporation transitoire de [carbonyl-<sup>14</sup>C] nicotinamide en nicotinate riboside (NAR) (Zheng *et al.*, 2004), suggérant l'existence chez les plantes d'une voie putative



**Figure 15. La compartimentation de la biosynthèse du NAD(P) chez les Mammifères.** Toutes les voies métaboliques n'interviennent pas nécessairement dans les mêmes cellules animales. Les points d'interrogation indiquent un doute quant à la localisation de l'enzyme. ARTs : ADP-ribose transférase ; CAC : cycle de Krebs ; cADPR : ADP-ribose cyclique ; CD38 : ectoenzyme à activité NADase/ADP-ribose cyclase ; ER : réticulum endoplasmique ; NAADP : NaAD phosphate ; NADase : enzyme bifonctionnelle NAD glycohydrolase/ADP-ribosyl cyclase ; NMNAT : N(a)MN adényltransférase ; Ox. Phos. : phosphorylation oxydative ; PARPs : polyADP-ribose polymérase. D'après Berger *et al.* (2004).

NAM → NA → NAR → NaMN. Chez cette même espèce, un marquage au quinolinate tritié indique une production de NMN à partir du NAD. Le métabolisme du NMN reste cependant très peu connu chez les plantes et des études ultérieures seront nécessaires pour déterminer l'importance de son implication dans le métabolisme du NAD.

Chez les bactéries, plusieurs études se sont intéressées au recyclage des pyridines nucléosides. Un transporteur de ribonucléoside codé par le gène *PnuC* permet l'entrée dans la cellule de NAMR, formé par l'action d'une phosphatase (AphA) qui transforme le NMN extracellulaire en NAMR (Merdanovic *et al.*, 2005). La protéine NadR à trois domaines permet de convertir le NAMR en NAD (Grose *et al.*, 2005 ; Kurnasov *et al.*, 2002 ; Raffaelli *et al.*, 1999).

### III. Transport des nucléotides à pyridine

---

Contrairement à l'état redox des différents compartiments cellulaires, le transport du NAD(P) est très peu connu. Comme discuté précédemment, la littérature indique que les premières étapes réactionnelles de la voie *de novo* conduisent à une production de QA dans le chloroplaste ainsi qu'une synthèse de NaMN. Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes uniques codant les NaMNAT et NADS sont dépourvus de séquences d'adressage spécifiques reconnues par les logiciels d'analyses *in silico*. Chez les Mammifères, trois isoformes des NaMNAT ont été caractérisées : une isoforme intranucléaire, une autre à l'extérieur du noyau et la troisième est cytosolique et/ou mitochondriale (Magni *et al.*, 2004 ; Berger *et al.*, 2004) (Figure 15). Une étude très récente suggère fortement une production de NAD *via* une NaMNAT mitochondriale à partir de NMN et de NaMN chez *Helianthus tuberosus* (Di Martino et Pallota, 2011). En outre, une expérience de colocalisation GFP montre que la NADS de levure est cytosolique et/ou nucléaire (Suda *et al.*, 2003). En somme, ces résultats suggèrent une participation du plaste et de la mitochondrie dans les dernières étapes enzymatiques de synthèse de NAD. De ce fait, des transporteurs chloroplastiques et





mitochondriaux semblent indispensables pour faire circuler le QA, le NaMN et le NAD entre les différents compartiments subcellulaires. Le NAD<sup>+</sup> et NADP<sup>+</sup> sont capables de traverser la membrane mitochondriale des plantes (Neuburger et Douce, 1983 ; Bykova et Møller, 2001) mais peu de données génétiques ou biochimiques sont disponibles sur les transporteurs de NAD.

Les nucléotides à pyridine sont des métabolites phosphorylés (donc chargés) et de taille relativement conséquente, ce qui les restreint putativement à une localisation intracellulaire, sans déplacement entre cellules. Toutefois, le plasma des Mammifères contient de faibles concentrations en NAD néanmoins nécessaires pour la signalisation *via* les ADP-ribosyl cyclases membranaires CD38 (Evans *et al.*, 2005). Haferkamp *et al.* (2004) ont également mis en évidence un transporteur de NAD (tNAD) chez une bactérie pathogène incapable de synthétiser du NAD et qui l'obtient de la cellule hôte probablement *via* un mécanisme d'échange d'ADP. Chez la levure et les plantes, deux gènes codant des tNAD mitochondriaux ont été identifiés (Todisco *et al.*, 2006). La caractérisation du produit d'un des deux gènes, NDT1, a montré une grande spécificité pour le NAD<sup>+</sup> ( $K_m = 0.38$  mM) et virtuellement aucune activité pour le NADH, NADP<sup>+</sup> ou NADPH mais une faible activité pour le NaAD (Todisco *et al.*, 2006). NDT1 catalyserait un transport unidirectionnel faible et un échange fort avec d'autres nucléotides (Todisco *et al.*, 2006). Une analyse par blast génomique révèle aussi que les deux homologues des tNAD mitochondriaux de levure existent chez plusieurs organismes dont *Arabidopsis thaliana* (Noctor *et al.*, 2006). Les deux protéines d'*Arabidopsis thaliana* possèdent des homologies de l'ordre de 30 % avec le transporteur NDT1 et leurs séquences correspondantes, annotées comme *adenine nucleotide translocator/mitochondrial substrate carrier*, sont prédites pour être localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Noctor *et al.*, 2006). Récemment, Palmieri *et al.* (2009) ont localisé AtNDT1 sur la membrane plastidiale et AtNDT2 sur celle des mitochondries. Les mêmes auteurs ont montré une forte expression des gènes codant ces deux transporteurs dans les tissus en développement et en particulier dans les cellules en conditions de fortes activités métaboliques. Il reste à savoir néanmoins si l'import mitochondrial/plastidial de NAD s'accompagne d'un échange de nucléotides, en particulier



de NaMN dont rien n'est connu sur sa destinée après sa production par la QPT chloroplastique.

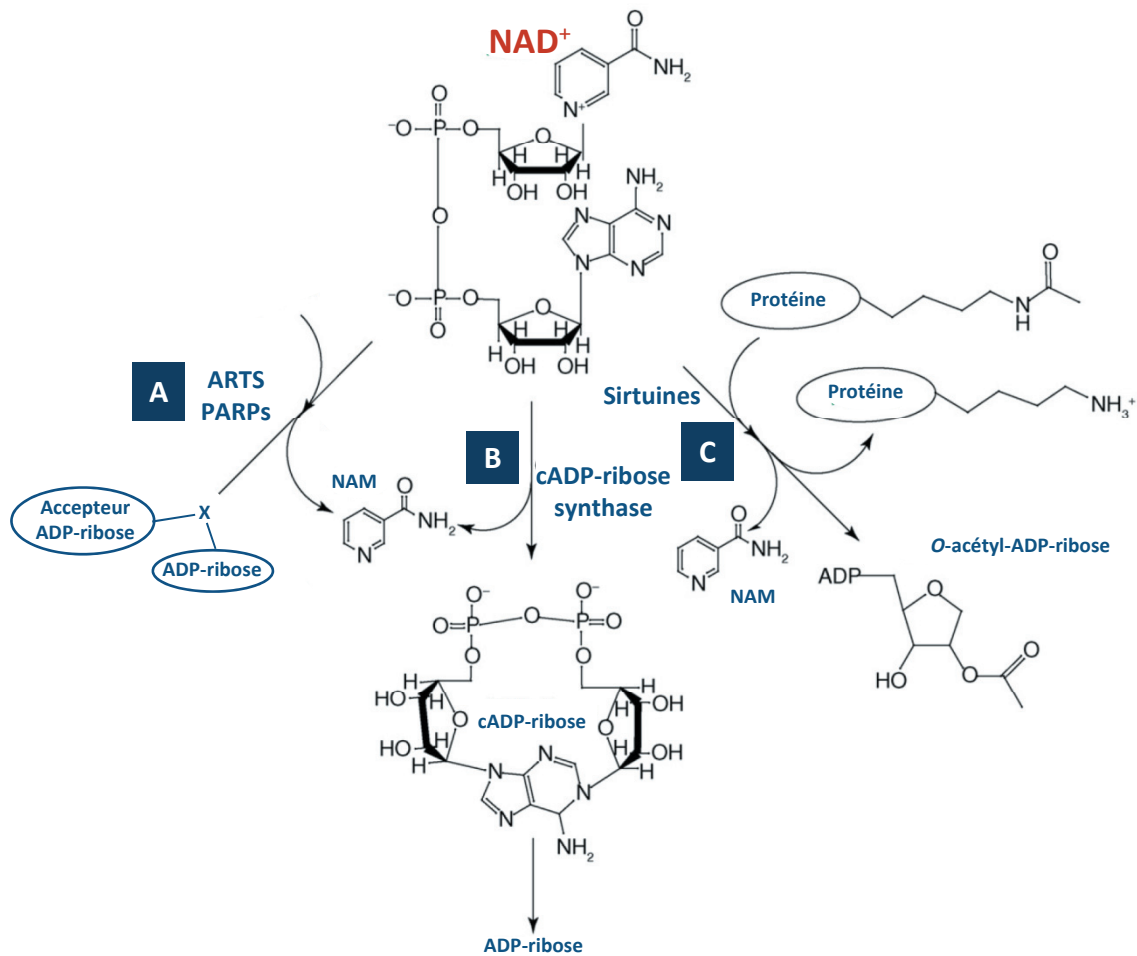
Il reste à établir dans quelle mesure le NADP est transporté, puisque les NADK se retrouvent dans différents organites. Il en est de même concernant le métabolisme nucléaire du NAD et le recyclage du NAM en relation avec les étapes réactionnelles cytosoliques. Des études cytologiques proposent un rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  comparable dans le noyau et le cytosol (Zhang *et al.*, 2002). Dans l'hypothèse d'un possible passage du NAD à travers les pores nucléaires, des variations de l'état rédox ou du pool global du NAD pourraient directement altérer la transcription des gènes chez les Animaux et la levure, par le biais d'une régulation rédox du corepresseur CtBT (Zhang *et al.*, 2002) ou *via* la disponibilité de substrat à des enzymes nucléaires catabolisant le  $\text{NAD}^+$  (Imai *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 2000) (cf catabolisme du NAD discuté ci-dessous).

Tout reste à découvrir, ou presque, quant au transport à plus grande échelle des nucléotides à pyridine, c'est-à-dire entre les cellules. Chez le tabac, la nicotine est acheminée des racines jusqu'aux feuilles où elle s'accumule après blessure foliaire (voir synthèse d'alcaloïdes). La ricinine quant à elle est retrouvée dans les sucs phloémiens chez le ricin (Holfelder *et al.*, 1998) et la trigonelline se déplace vraisemblablement entre les organes dans les plantules de haricot mungo (Zheng *et al.*, 2005).

#### IV. Catabolisme du NAD

---

Outre le rôle oxydoréducteur des nucléotides à pyridine, la littérature ne cesse d'apporter les preuves d'un rôle pivot pour le NAD dans la signalisation cellulaire (Berger *et al.*, 2004 ; Hunt *et al.*, 2004 ; Noctor *et al.*, 2006). Chez les Eucaryotes, ces fonctions qui vont cliver la molécule de NAD pour former du NAM, incluent la synthèse d'ADP-ribose cyclique,



**Figure 16. Le NAD<sup>+</sup> comme substrat de processus de signalisation cellulaire.** A : transfert d'ADP-ribose catalysé par les ADP-ribose transférases (ARTs) et les polyADP-ribose polymérase (PARPs) avec production de nicotinamide (NAM). Dans le cas des PARPs, l'accepteur d'ADP-ribose peut être une molécule même d'ADP-ribose, formant ainsi du polyADP-ribose. B : la cADP-ribose synthase cyclise le groupement ADP-ribose du NAD<sup>+</sup> en cADP-ribose, avec production concomitante de NAM. C : Les sirtuines désacétylent les protéines en transférant la partie ADP-ribose du NAD<sup>+</sup> sur un groupement acétyle porté par la lysine d'une protéine, avec libération de NAM et d'O-acétyl-ADP-ribose. Chacune des réactions de clivage du NAD<sup>+</sup> engendre une production de NAM qui inhibe l'enzyme correspondante. D'après [Belenky et al. \(2007\)](#).

la mono- et poly-ADPribosylation et la désacétylation des protéines. Les bactéries possèdent en outre des ADN ligases NAD-dépendantes mais dont l'activité est ATP dépendante chez les Eucaryotes (Schär *et al.*, 1997). Chez les plantes, l'implication des nudix hydrolases dans la dégradation du NAD reste à préciser (Ogawa *et al.*, 2005 ; Hashida *et al.*, 2009). Le catabolisme du NAD est étroitement associé à divers processus de signalisation cellulaire impliqués dans la réponse aux stress chez les plantes. Cet aspect sera discuté en détail dans la partie VII (Autres rôles pour le NAD dans la signalisation cellulaire).

### A. Le NAD, précurseur de la synthèse de l'ADP-Ribose cyclique (cADPR)

---

La synthèse d'ADP-ribose cyclique (cADPR) par l'ADP-ribose synthase nécessite du NAD comme précurseur (**Figure 16 B**). Cette molécule signal joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie du second messager calcique  $Ca^{2+}$ , en entraînant sa libération des stocks intracellulaires par liaison avec une classe de récepteurs à la ryanodine. Un nombre grandissant d'études a montré chez les Animaux, comme chez les plantes, que ces ions  $Ca^{2+}$  peuvent participer à divers processus physiologiques. Chez l'Homme, le  $Ca^{2+}$  libéré du réticulum endoplasmique peut notamment déclencher la contraction des muscles striés (Guse, 2004a ; 2004b). Chez les plantes, la synthèse du cADPR est mal connue, mais ce messager est impliqué dans différents processus physiologiques (Hunt *et al.*, 2004).

### B. Le NAD, substrat des polyADP-Ribose Polymérase (PARPs)

---

Le  $NAD^+$  peut intervenir comme substrat pour des réactions de mono- et poly-ADP ribosylations (**Figure 16 A**). Ces réactions de transfert d'ADPR font intervenir les ADP-ribosyltransférases (ARTs) et les polyADPR polymérase (PARPs) qui vont former des polymères d'ADPR par greffage d'une ou plusieurs parties ADPR sur des protéines essentiellement nucléaires (Diefenbach, 2005). Ces mécanismes de modification post-traductionnelle jouent un rôle dans la régulation de divers processus cellulaires comme la



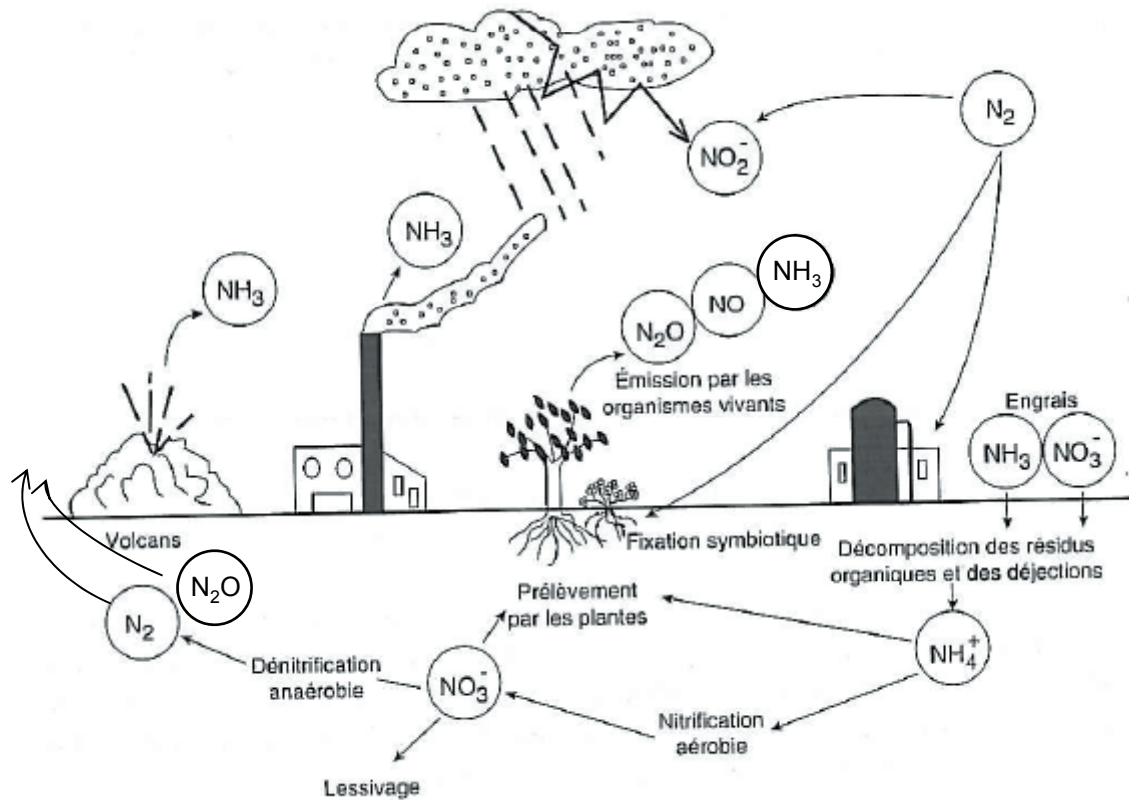
réparation de l'ADN, la transcription des gènes, ou encore l'apoptose (Vanderauwera *et al.*, 2007). Il est important de souligner que ces enzymes PARPs sont inhibées par le nicotinamide, produit du catabolisme du NAD<sup>+</sup> (Hunt *et al.*, 2004).

### C. Le NAD, substrat des désacétylations catalysées par les sirtuines

---

Enfin, le NAD<sup>+</sup> peut également être dégradé par certaines désacétylases NAD-dépendantes ubiquistes, appelées sirtuines (**Figure 16 C**). Le membre le plus connu de cette famille est SIR2 pour *Silent Information Regulator 2*, très étudié jusqu'alors chez la levure (North, 2004). La désacétylation d'histones et de facteurs de transcription (TF) par les sirtuines est impliquée dans des phénomènes de régulations épigénétiques (*silencing* de la chromatine, réparation de l'ADN, cycle cellulaire), intervenant essentiellement dans des contextes de stress ou de sénescence (Blander et Guarente, 2004 ; Robyr *et al.*, 2002). En effet, la désacétylation entraîne un remodelage de la structure chromatinienne et module ainsi l'activité transcriptionnelle. Notons également que la protéine SIR2 est considérée comme un "régulateur universel" de la longévité (Trapp *et al.*, 2006).





**Figure 17. Cycle simplifié de l'azote.** L'azote atmosphérique représente la principale source d'azote de la planète. On trouve également dans l'atmosphère, mais en très faible quantité, de l'ammoniac ( $NH_3$ ) et des oxydes d'azote ( $N_2O$ ,  $NO_2$ ,  $NO$ ) qui sont les produits des combustions et des activités volcaniques. Les organismes vivants peuvent aussi rejeter de faibles quantités de  $NH_3$  dans l'atmosphère. Les ions nitrate ( $NO_3^-$ ) sont surtout le produit de l'oxydation de  $N_2$  par l' $O_2$  ou par l'ozone ( $O_3$ ) sous l'effet des éclairs et des radiations ultraviolettes.  $NO_3^-$  peut également provenir des océans et être apporté sur les côtes sous forme d'aérosols. En fait, une très faible partie de l'azote atmosphérique est entraînée au sol sous une forme ou une autre, par les précipitations. Une autre partie de l'azote provient de la fixation de l'azote moléculaire par les microorganismes. L'azote assimilé par les organismes vivants est restitué au sol après décomposition de la matière organique végétale et animale par les bactéries, champignons, protozoaires, etc. La transformation par les microorganismes est appelée minéralisation. Les composés organiques azotés dégradés sont utilisés comme source d'énergie et de carbone, et l'azote, non utilisé par les microorganismes, est libéré généralement sous forme d'ammonium  $NH_4^+$ . La libération de l'azote du sol dépend du rapport C/N des résidus organiques et des conditions climatiques, température notamment. La transformation de l'azote en l'une ou l'autre de ces formes constitue un système complexe entre sol et atmosphère, appelé *cycle de l'azote*. D'après Morot-Gaudry (1997).

## V. Rôles du NAD dans le métabolisme rédox

---

Par sa capacité à transférer des électrons, le NAD est un transducteur d'énergie vital pour nombre de processus métaboliques où il intervient comme coenzyme oxydoréducteur impliqué dans le métabolisme de réduction-oxydation d'une multitude de substrats. Tout un ensemble d'enzymes de la classe des oxydoréductases nécessite ce cofacteur. Chez les végétaux, le métabolisme de l'azote fourmille d'exemples d'utilisation du NAD comme coenzyme rédox, depuis l'assimilation des nitrates jusqu'au métabolisme des acides aminés.

### A. Un rôle pour le NAD dans le métabolisme azoté

---

#### 1. L'azote, un macroélément indispensable aux végétaux

---

L'azote (N) est l'un des macroéléments majeurs, nécessaire à la synthèse de diverses biomolécules (acides aminés, acides nucléiques, chlorophylles, protéines, etc.). Ce composé est abondamment présent dans l'atmosphère sous forme de diazote ( $N_2$ ) chimiquement inerte qui par conséquent ne peut être utilisé sous cette forme par de très nombreux organismes. Afin d'être métabolisé par les Animaux et les plantes, le  $N_2$  doit subir une transformation ou fixation en d'autres composés chimiquement et biologiquement actifs tels que l'ammoniac ( $NH_3$ ), l'ammonium ( $NH_4^+$ ), l'oxyde nitreux ( $N_2O$ ), le dioxyde d'azote ( $NO_2$ ), les nitrates ( $NO_3^-$ ), les nitrites ( $NO_2^-$ ) ou d'autres composés organiques comme l'urée, les amines, les protéines et les acides aminés (**Figure 17**).

Les plantes ne dérogent pas à cette règle et ne peuvent assimiler seules le  $N_2$  atmosphérique. Certaines espèces végétales (Légumineuses) ont en revanche développé une symbiose racinaire avec des bactéries du genre *Rhizobium*. Cette interaction permet aux microorganismes pourvus de nitrogénases de fixer l'azote gazeux dans des composés azotés



1 cm

**Figure 18. Nodosités sur racines de pois.** D'après Crawford *et al.* (2000).

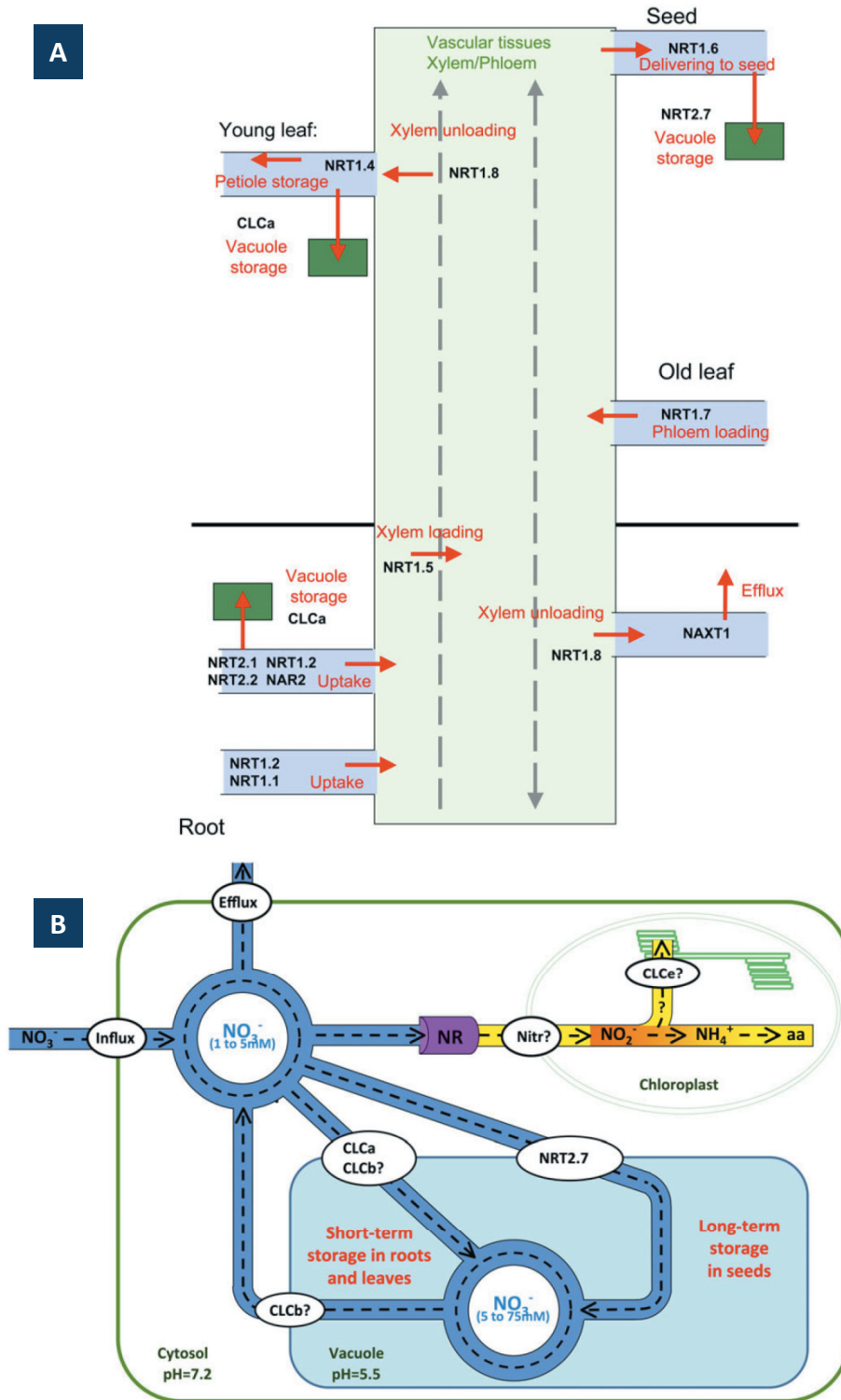
que les plantes pourront métaboliser (**Figure 18**). En échange, les végétaux synthétisent des polysaccharides qui fourniront de l'énergie aux bactéries. Les plantes peuvent parfois obtenir l'azote à partir de composés organiques (acides aminés et protéines) souvent en association avec des mycorrhizes (Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2008). L'azote inorganique provient en général de la minéralisation de la matière organique voire parfois des pluies (Brady et Weil, 1999). Ces phénomènes conduisent *in fine* à une formation d'ions nitrates dans le sol (**Figure 17**). Il est également possible de retrouver des ions ammonium ou nitrites dans les fractions du sol. L'ammonium peut être converti en nitrites puis en nitrates (phénomène de nitrification) par des bactéries en conditions d'aérobiose. Nitrates et ammonium se distinguent de par leur charge et donc leurs propriétés physico-chimiques. Les nitrates, chargés négativement, sont plus faiblement retenus par le complexe argilo-humique du sol, ce qui les rend plus facilement disponibles pour les racines des plantes, mais également plus facilement lessivables (**Figure 17**). L'ammonium quant à lui, de part sa charge positive aura tendance à se lier aux particules du sol.

## 2. Transport du nitrate et de l'ammonium du sol

---

La plupart des végétaux est tributaire de l'azote disponible dans le sol sous forme d'ions  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ . L'absorption racinaire de ces ions s'effectue grâce à une large gamme de transporteurs (**Figure 19 A**).

Pour transporter les nitrates, deux types de transporteurs coexistent. Les uns sont dits à faible affinité (LATS pour *Low Affinity Transport System*), actifs à fortes concentrations en  $\text{NO}_3^-$  (supérieures à 1 mM). Les autres constituent les transporteurs à haute affinité (HATS) qui sont fonctionnels pour des concentrations en  $\text{NO}_3^-$  plus faibles (entre 1  $\mu\text{M}$  et 1 mM). Parmi les HATS, certains sont constitutivement actifs (cHATS), d'autres induits (iHATS) (Wang et Crawford, 1996). Ces transporteurs peuvent également être séparés en deux grandes familles multigéniques chez *Arabidopsis thaliana* : NRT1 et NRT2 (Forde, 2000 ; Miller *et al.*, 2007 ; Dechorgnat *et al.*, 2011). Les NRT1 sont représentés chez *Arabidopsis*

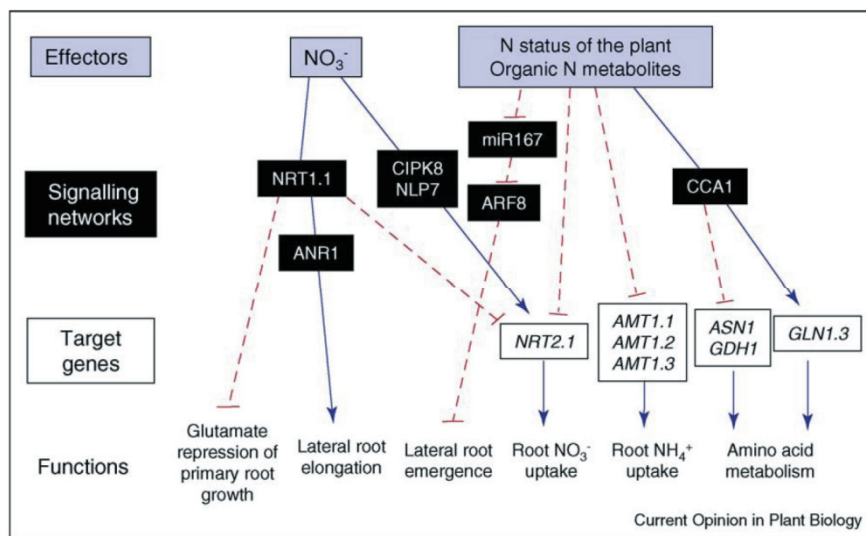


**Figure 19. Le transport des ions nitrate chez *Arabidopsis thaliana*.** A : représentation schématique de la voie empruntée par les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) à l'échelle de la plante. B : Circulation des nitrates dans la cellule végétale. aa : acides aminés ; chloroplast : chloroplaste ; CLC, NAR, NAXT et NRT : transporteurs de nitrates ; delivering : fourniture ; leaf : feuille ; loading/unloading : chargement/déchargement ; long-term/short-term storage : stockage à long terme/court-terme ; Nitr? : transporteurs de nitrites ;  $\text{NO}_2^-$  : nitrites ;  $\text{NH}_4^+$  : ammonium ; NR : nitrate réductase ; old : ancien ; root : racine ; seed : graine ; vascular tissues : tissus vasculaires ; uptake : absorption ; young : jeune. D'après Dechorgnat *et al.* (2011).

*thaliana* par 53 gènes, avec *NRT1.1* qui a été bien caractérisé comme LATS. Sept représentants *NRT2* appartiennent à la famille des porteurs nitrate-nitrite (NNP), dont le plus connu *AtNRT2.1* a été caractérisé comme transporteur iHATS dans la racine (Chopin *et al.*, 2007a ; Dechorgnat *et al.*, 2011).

Le transport de l'ammonium implique le plus souvent des systèmes de transport à haute affinité, même si  $\text{NH}_4^+$  peut franchir les membranes. Il n'en demeure pas moins quelques systèmes à faible affinité, en particulier lorsque le pH extérieur du sol est élevé. Les ions  $\text{NH}_4^+$  sont transportés par des protéines initialement découvertes chez la levure et les plantes, appelées AMT (*ammonium transport*) (Marini *et al.*, 1994). Le premier gène isolé chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* correspond au transporteur *AMT1.1*, dont l'activité à forte affinité est responsable de l'essentiel de l'assimilation du  $\text{NH}_4^+$  lors d'une déficience en  $\text{NO}_3^-$  (Gazzarrini *et al.*, 1999). Six représentants codent les AMT chez *Arabidopsis thaliana* (Ludewig *et al.*, 2007).

Une régulation transcriptionnelle des gènes de transport du  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$  a été montrée (Figure 20). Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, de faibles concentrations en  $\text{NO}_3^-$  induisent l'expression du gène *AtNRT2.1* (Filleur et Daniel-Vedele, 1999). Les gènes AMT sont induits à la lumière par le métabolisme carboné, par la carence azotée et montrent une régulation au cours de la photopériode (Lejay *et al.*, 2003 ; Loqué *et al.*, 2005 ; 2006). Une resupplémentation en  $\text{NH}_4^+$  après carence azotée entraîne également l'inhibition glutamine-dépendante de l'expression d'*AMT1.1* (Rawat *et al.*, 1999). Ce gène n'est pas seulement régulé au niveau transcriptionnel lors d'une carence en azote, mais également au niveau de la dégradation des transcrits dans les racines (Yuan *et al.*, 2007a ; 2007b).



**Figure 20. Vue simplifiée des mécanismes régulateurs du développement racinaire et de l'absorption azotée chez *Arabidopsis thaliana*.** Deux effecteurs (effectors) principaux sont considérés : les ions nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et certains composés organiques azotés (acides aminés). Amino acids metabolism : métabolisme des acides aminés ; ANR1 : facteur de transcription ; ASN1 : gène de l'asparagine synthétase 1 ; CCA1 : gène *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* ; CIPK8 protéine kinase interagissant avec CBL ; fonctions : fonctions ; GDH1 : gène de la glutamate déshydrogénase 1 ; GLN1.3 : gène de la glutamine synthétase 1 ; glutamate repression of primary root growth : répression de la croissance de la racine principale par le glutamate ; lateral root elongation : élongation des racines latérales ; lateral root emergence : émergence des racines latérales ; miR167 et ARF8 : microRNA ; N status of the plant : statut azoté de la plante ; NLP7 : protéine NIN-like 7 ;  $\text{NH}_4^+$  : ammonium ; NRT : transporteur de nitrates ; root uptake : absorption racinaire ; Organic N metabolites : métabolites azotés organiques ; signalling networks : réseau de signalisation ; target genes : gènes cibles D'après Gojon *et al.* (2009).

### 3. La Nitrate Réductase, *point d'entrée* du métabolisme azoté, nécessite le NAD(P)H

---

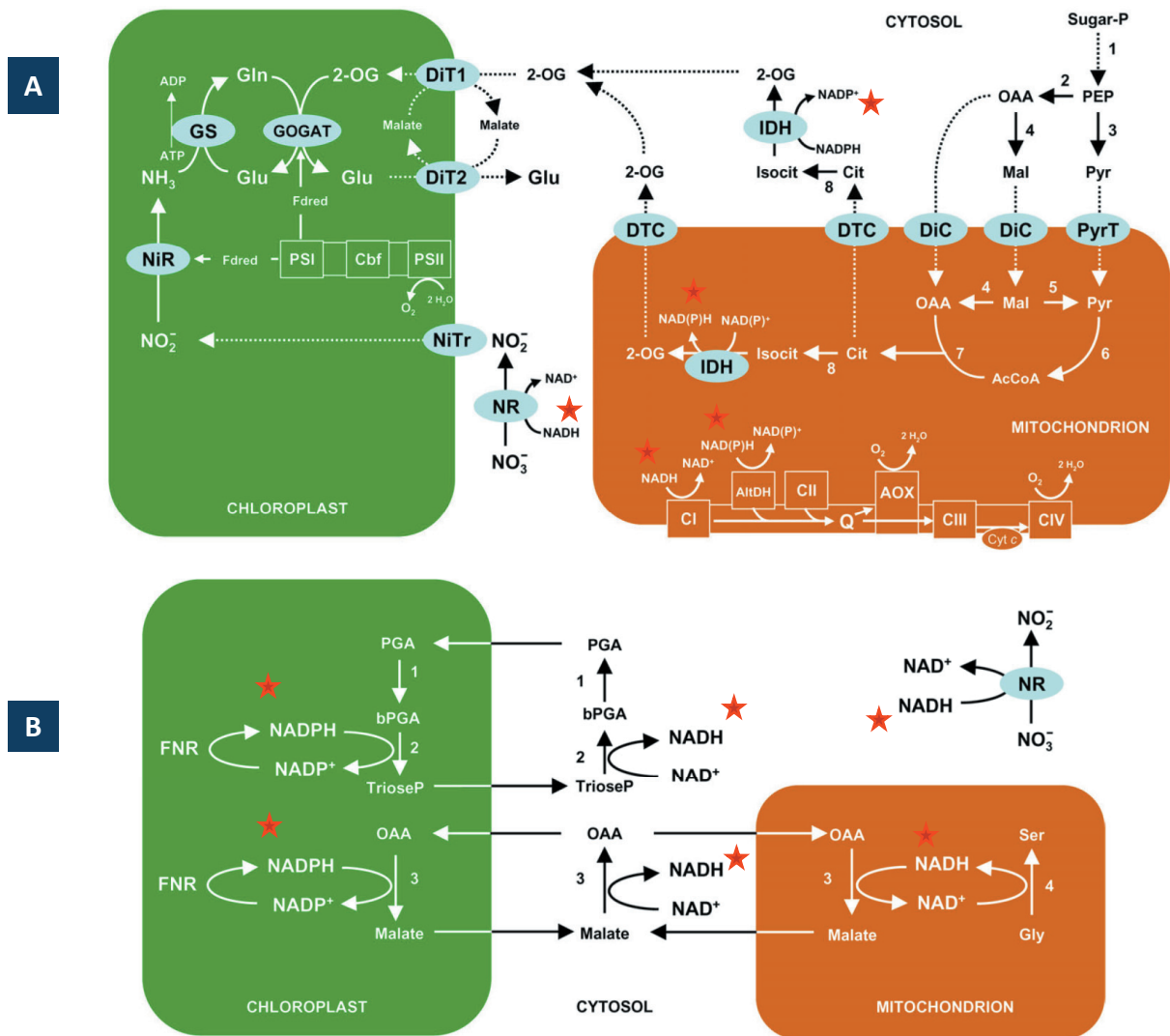
La première étape d'assimilation des nitrates est réalisée par le transport racinaire de ces ions. S'ensuit une réduction des nitrates en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) par la nitrate réductase (NR, EC 1.6.6.1) (**Figures 19 B et 21 A**). Vient ensuite le transport des nitrites vers le chloroplaste où ils sont réduits en ammonium par la nitrite réductase (NiR, EC 1.7.1.4). Les étapes réactionnelles qui suivent sont communes à l'assimilation du  $\text{NO}_3^-$  et du  $\text{NH}_4^+$ . Le  $\text{NH}_4^+$  est d'abord incorporé en glutamine (Gln), premier acide aminé synthétisé par la glutamine synthétase (GS, EC 6.3.1.2), puis la glutamate synthase (GOGAT, EC 1.4.1.1/14) produit le glutamate (Glu) (Meyer et Stitt, 2001). L'assimilation des nitrates et de l'ammonium conduit ainsi à la formation de la Gln et du Glu, qui constituent les deux premiers composés organiques azotés synthétisés (Forde et Lea, 2007 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

L'étude de la NR a bénéficié d'une attention particulière chez les végétaux en raison de son rôle comme *point d'entrée* dans l'assimilation de l'azote. Il s'agit d'une enzyme soluble homodimérique d'environ 800 kDa possédant deux sites de liaison : un site qui fixe le  $\text{NO}_3^-$  et un autre site qui fixe le NADH. La NR est codée chez *Arabidopsis thaliana* par les gènes *NIA1* et *NIA2* ; *NIA2* serait responsable de 90 % de l'activité NR (Cheng *et al.*, 1988 ; Wilkinson et Crawford, 1991). Deux formes dites bi-spécifiques de la NR existent selon qu'elles métabolisent le NADH ou le NADPH (Srivastava et Shankar, 1996). Ces deux formes possèdent trois cofacteur : une sous-unité qui lie le FAD, un hème-Fe et un cofacteur à molybdène (MoCo) (Redinbaugh et Campbell, 1985 ; Caboche et Rouze, 1990). Ces trois cofacteurs fournissent les centres rédox qui facilitent le transfert d'électrons nécessaires à la réduction :



La réduction des ions  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$  est régulée biochimiquement avec l'induction de l'activité NR par les  $\text{NO}_3^-$  eux-mêmes (Daniel-Vedele et Caboche, 1996 ; Lillo *et al.*, 2004). Une régulation au niveau transcriptionnel et post-traductionnel a également été rapportée





**Figure 21. Représentations schématiques simplifiées des interactions entre les métabolismes carboné et azoté lors de l'assimilation de l'ammonium.** A : Les cofacteurs rédox sont indiqués par une étoile rouge pour la réduction des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), l'assimilation de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), la réaction catalysée par l'isocitrate déshydrogénase (IDH) et la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. En pointillés figurent les mouvements, transports ou étapes réactionnelles condensées. Certaines réactions sont réversibles comme l'interconversion de l'oxaloacétate (OAA) et du malate. Les numéros indiquent les réactions catalysées par (1) enzymes glycolytiques ; (2) phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase ; (3) pyruvate kinase ; (4) malate déshydrogénase ; (5) enzyme malique ; (6) pyruvate déshydrogénase ; (7) citrate synthase ; (8) aconitase. AcCoA : acétylcoenzyme A ; AltDH : déshydrogénases alternes mitochondriales ; AOX : oxydase alterne mitochondriale ; CI, CII, CIII, CIV : complexes I, II, III, et IV de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons ; Cbf : complexe du cytochrome b6f ; Cit : citrate ; Cyt c : cytochrome c ; DiC : *mitochondrial inner membrane dicarboxylate carrier* ; DiT1, DiT2 : échangeurs de décarboxylates de l'enveloppe interne chloroplastique ; DTC : échangeurs de tricarboxylates/décarboxylates de la membrane interne mitochondriale ; Fd : ferrédoxine ; GS : glutamine synthétase ; GOGAT : glutamate synthase ; IDH : isocitrate déshydrogénase ; Isocit : isocitrate ; Mal : malate ; NiR : nitrite réductase ; NiTr : *nitrite transporter* ; NR : nitrate réductase ; PSI, PSII : photosystèmes I et II ; Pyr : pyruvate ; PyrT : *pyruvate transporter* ; Q : ubiquinone ; Sugar-P : sucres phosphates. B : ponts rédox métaboliques majeurs dans le chloroplaste et la mitochondrie avec production cytosolique de NADH. La NR est localisée dans le cytosol et utilise le pouvoir réducteur du NADH. 1 : PGA kinase ; 2 : NAD/P glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; 3 : NADP- or NAD-linked malate déshydrogénase ; (4) glycine décarboxylase. 2-OG : 2-oxoglutarate ; FNR : ferrédoxine-NADP réductase ; bPGA, 1,3-bisphosphoglycérate ; 3-PGA, 3-phosphoglycérate ; chloroplast : chloroplaste ; mitochondrion : mitochondrie. D'après Foyer *et al.* (2011).

(Vincentz et Caboche, 1991). En effet, les gènes *NIA* sont induits par le saccharose, la lumière et les cytokinines, alors qu'ils sont réprimés par l'ammonium et certains acides aminés (Nussaume *et al.*, 1995 ; Lillo *et al.*, 1994 ; Yu *et al.*, 1998). La transcription des gènes *NIA* est également modulée par le rythme circadien (McClung et Kay, 1994 ; Lillo *et al.*, 2001). Au niveau de son activité, la NR est régulée par diverses protéines kinases, phosphatases et protéases. En outre, la lumière, les fortes concentrations en CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> activent la NR, alors que le passage à l'obscurité, le peu de CO<sub>2</sub> et le manque d'O<sub>2</sub> diminuent cette activité enzymatique (MacKintosh et Meek, 2001 ; Crawford et Forde, 2002). Cette régulation enzymatique implique aussi la phosphorylation d'un résidu sérine (Ser) et la liaison consécutive en présence de Mg<sup>2+</sup> d'une protéine de type 14-3-3 qui inactive l'enzyme (Bachmann *et al.*, 1995 ; Kaiser *et al.*, 2001 ; 2002). En somme, la régulation de la NR est plus post-traductionnelle que transcriptionnelle (Lea *et al.*, 2006). Ce contrôle est relativement rapide (entre 5 et 20 minutes) et permet vraisemblablement de limiter une accumulation de nitrites toxiques dans les plantes (Lillo *et al.*, 2003).

Le pouvoir réducteur contenu dans les nucléotides à pyridine est indispensable au fonctionnement d'une batterie de voies métaboliques. La **Figure 21** illustre la voie d'assimilation des nitrates vers l'incorporation des acides aminés, dont un certain nombre de réactions nécessite le pouvoir réducteur du NAD(P)H.

### B. Homéostasie du NAD et métabolisme primaire (C, N)

---

Le contrôle des interactions carbone/azote (C/N) constitue un réseau extrêmement complexe, impliquant des signaux émanant des nitrates, de l'ammonium, des métabolites contenant de l'azote (N) comme le Glu, la Glu, l'Asp, ainsi que des signaux du métabolisme carboné (Coruzzi et Zhu, 2001 ; Stitt et Krapp, 1999 ; Miller *et al.*, 2008). Qui plus est, il apparaît évident que les niveaux de NADH jouent un rôle critique dans l'assimilation des nitrates et de l'ammonium (Dutilleul *et al.*, 2005). Ces signaux métaboliques interagissent

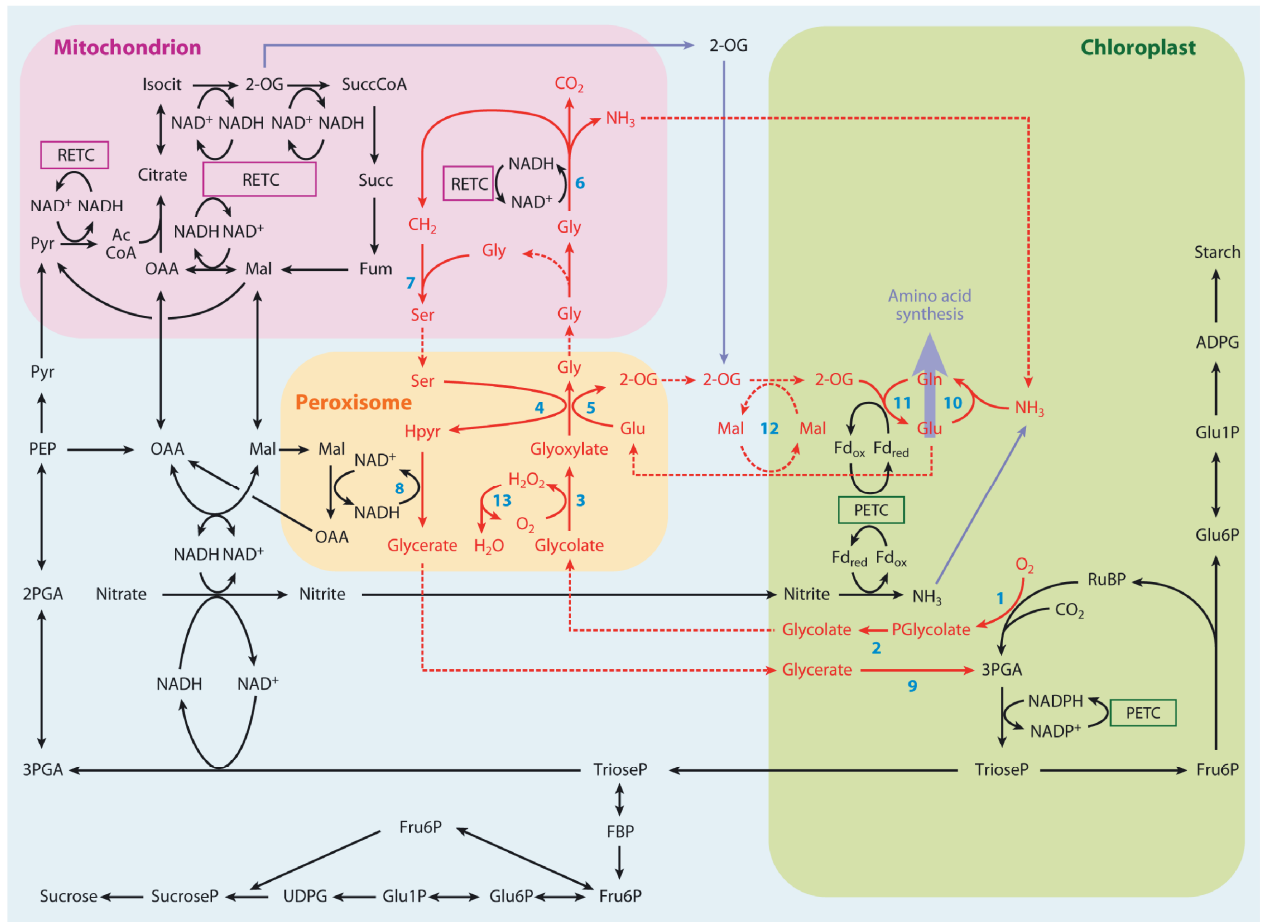


avec des hormones qui répondent à la disponibilité en N et régulent le métabolisme et le développement (Coruzzi et Zhu, 2001 ; Sakakibara *et al.*, 2006 ; Argueso *et al.*, 2009).

### 1. Implication du NAD(P)H dans la réduction des nitrates

---

Il est établi de longue date que l'assimilation de l'azote inorganique s'accompagne d'une fixation de C adéquate afin de fournir les squelettes carbonés qui vont servir d'accepteur à l'N assimilé. Ces processus requièrent des niveaux importants d'ATP et de pouvoir réducteur sous forme NAD(P)H (Nunes-nesi *et al.*, 2010) (Figure 21). Outre le pouvoir réducteur, d'autres facteurs comme l'ATP et la photorespiration influent sur l'assimilation de l'N. La NR semble constituer un verrou majeur dans le contrôle de l'assimilation de l'azote par les plantes. Sa production et son activité sont étroitement régulées, permettant d'engager de manière contrôlée, en réponse à des signaux comme la disponibilité en nitrates et en lumière, la réduction des nitrates disponibles dans la feuille et qui sont mis en réserve dans la vacuole. Les paramètres biochimiques relatifs à la NR mesurés *in vivo* semblent indiquer que la concentration en NADH disponible dans le cytosol des cellules végétales n'est pas limitante pour le fonctionnement de l'enzyme ( $K_m$  NADH de l'ordre du micromolaire) (Sanchez et Heldt, 1990 ; Wigge *et al.*, 1993). La question d'une limitation de l'activité NR par les teneurs en NADH reste cependant ouverte. En effet, dans certaines circonstances, comme l'illustre l'étude récente de Bloom *et al.*, (2010), des teneurs élevées en CO<sub>2</sub> diminuent l'assimilation des nitrates chez le blé comme *Arabidopsis thaliana*. Ainsi, une élévation des teneurs en CO<sub>2</sub> réduit la photorespiration, pouvant mener à une chute du pool de NADH nécessaire à la réduction des nitrates. Pour autant, cette observation n'apparaît reproduite que lorsque la teneur en nitrates est limitante (Stitt et Krapp, 1999). Une élévation de la teneur en CO<sub>2</sub> pourrait dans ce cas éventuellement entraîner une compétition pour le pouvoir réducteur entre les voies d'assimilation du C et de l'N.



**Figure 22. La photorespiration est au carrefour des métabolismes carboné photosynthétique et azoté.** Les réactions numérotées sont catalysées par les protéines suivantes : 1, Rubisco ; 2, Phosphoglycolate phosphatase; 3, Glycolate oxydase ; 4, Serine:glyoxylate aminotransférase ; 5, Glutamate:glyoxylate aminotransférase ; 6, Glycine décarboxylase ; 7, Sérine hydroxyméthyltransférase ; 8, Hydroxypyruvate réductase ; 9, Glycérate kinase ; 10, Glutamine synthétase ; 11, Glutamate synthase (GOGAT) ; 12, échangeurs de dicarboxylates ; 13, Catalase. 2-OG : 2-oxoglutarate ; 2-PGA : 2-phosphoglycérate ; 3-PGA : 3-phosphoglycérate ; AcCoA : acétylCoA ; ADPG : ADP glucose ; Amino acid synthesis : synthèse des acides aminés ; chloroplast : chloroplaste ; FBP : fructose 1,6-bisphosphate ; Fd : ferrédoxine ; Fru6P : fructose 6-phosphate ; Fum : fumarate ; Gln : glutamine ; Glu : glutamate ; Glu1P : glucose 1-phosphate ; Glu6P : glucose 6-phosphate ; Gly : glycine ; Hpyr : hydroxypyruvate ; Isocit : isocitrate ; mal : malate ; mitochondrion : mitochondrie ; OAA : oxaloacétate ; Pglycolate : phosphoglycolate ; PEP : phosphoenolpyruvate ; PETC, chaîne de transport d'électrons photosynthétique chloroplastique ; Pyr : pyruvate ; RET : transport d'électrons respiratoires ; RuBP : ribulose 1,5-bisphosphate ; Ser : sérine ; Succ : succinate ; SuccCoA : succinyl CoA ; Starch : amidon ; Sucrose : saccharose ; SucroseP : saccharose phosphate ; TrioseP : triose phosphate ; UDPG : UDP glucose. D'après *Foyer et al. (2009)*.

### 2. Le recyclage rédox mitochondrial, acteur clé de la ré-assimilation de l'azote

---

Les interactions entre la fixation du C par la photosynthèse et l'assimilation de l'N dans les feuilles chez les plantes en C<sub>3</sub> sont très fortement influencées par la photorespiration. Pendant ce processus, le dégagement de CO<sub>2</sub> et d'ammonium se produit dans la mitochondrie durant la conversion de Gly en Ser et on estime qu'en conditions atmosphériques normales pour quatre tours de cycle de Calvin, un tour de cycle forme du 2-phosphoglycolate (2-PGA), produit de l'activité oxygénase de la Rubisco (Zhu *et al.*, 2008a) (**Figure 22**). Le flux métabolique de la photorespiration est donc très important et la conversion mitochondriale de la Gly vers la Ser produit beaucoup d'ammonium, entre 10 et 20 fois plus que n'en produit l'assimilation primaire de l'azote (Keys *et al.*, 1978, Rachmilevitch *et al.*, 2004). Cette forte production d'ammonium doit être ré-assimilée sous forme de Glu par l'utilisation de deux enzymes localisées à la fois dans le chloroplaste mais aussi dans la mitochondrie : la Gln synthétase (GS2) et la Fd-GOGAT (GLU1) (Taira *et al.*, 2004 ; Jamai *et al.*, 2009). L'activité GS2 est responsable de la récupération d'ammonium, catalysant la condensation de Glu et d'ammonium en Gln. La Gln est ensuite utilisée en présence de 2-oxoglutarate (2-OG) par la Fd-GOGAT, pour recycler le Glu qui est requis pour la synthèse de Gly et la refixation d'ammonium. Ce processus est appelé cycle de l'N photorespiratoire (Keys, 2006) (**Figure 22**) et utilise les mêmes isoformes de GS et GOGAT que celles impliquées dans l'assimilation primaire de l'ammonium (Hirel et Lea, 2002). Le NADH produit par l'oxydation de la Gly dans les mitochondries peut contribuer à l'augmentation du pool de NADH dans le cytosol à la lumière. Ainsi, la capacité des chloroplastes et des mitochondries à délivrer des équivalents réducteurs au cytosol peut influencer le taux d'assimilation des nitrates (Krömer et Heldt, 1991 ; Hanning et Heldt, 1993). A l'inverse, une faible photosynthèse peut limiter l'activité NR par une baisse de la disponibilité en réducteurs (NADH) et par une inactivation post-traductionnelle de l'enzyme (Kaiser *et al.*, 2000 ; 2002). Par ailleurs, le chloroplaste peut fournir du pouvoir réducteur au cytosol par les navettes trioses-P (Foyer *et al.*, 2011) (**Figure 22**). En revanche, les données de la littérature suggèrent que le transfert de pouvoir réducteur se fait principalement par les navettes malate/oxaloacétate (OAA) des plastes et des mitochondries. Cette



interprétation est en accord avec l'augmentation du pool de NAD(P)H cytosolique en conditions photorespiratoires, lequel stimule l'assimilation des nitrates (Foyer *et al.*, 2011).

La synthèse des acides aminés nécessite une réduction des nitrates et la génération de molécules carbonées comme le 2-OG. La production de 2-OG nécessite l'oxydation de composés carbonés par les voies métaboliques respiratoires (Hodges, 2002 ; Foyer et Noctor, 2003). Il semble également qu'*Arabidopsis thaliana* stocke d'importantes quantités de fumarate à la lumière (Pracharoenwattana *et al.*, 2010). Cet acide organique précurseur du 2-OG joue un rôle déterminant dans la synthèse d'acides aminés, particulièrement en conditions de faible disponibilité en azote.

La production d'ATP à la lumière dans les chloroplastes est insuffisante en regard des besoins requis par le fonctionnement du cycle de Calvin et la synthèse de produits issus de la fixation du carbone. Dans ces conditions, un apport d'ATP venant de l'oxydation mitochondriale apparaît indispensable (Wigge *et al.*, 1993 ; Igamberdiev et Gardeström, 2003). Le NADPH serait alors exporté des chloroplastes par la navette malate/OAA, générant du NADH qui peut être oxydé par les mitochondries pour produire de l'ATP (Scheible *et al.*, 2004). S'ajoute à cela, en conditions photorespiratoires, une forte production de NADH par la glycine décarboxylase (GDC, EC 14.4.2) et qui peut contribuer à la synthèse d'ATP indépendamment de ce qui est généré par le cycle de Krebs (Douce *et al.*, 2001). En effet, des mesures de NAD(H) mitochondrial montrent que les ratio NADH/NAD augmentent en conditions photorespiratoires (Wigge *et al.*, 1993).

### 3. La modulation de la balance rédox influe fortement sur la coordination des métabolismes C et N

---

Des études récentes menées au laboratoire indiquent que le statut redox jouerait un rôle dans l'intégration des métabolismes C et N (Dutilleul *et al.*, 2005 ; Hager *et al.*, 2010). Chez le mutant du complexe I mitochondrial *CMSII* de *Nicotiana sylvestris* produit par Rosine De Paepe au laboratoire, l'ajustement des voies respiratoires est associé à des altérations de





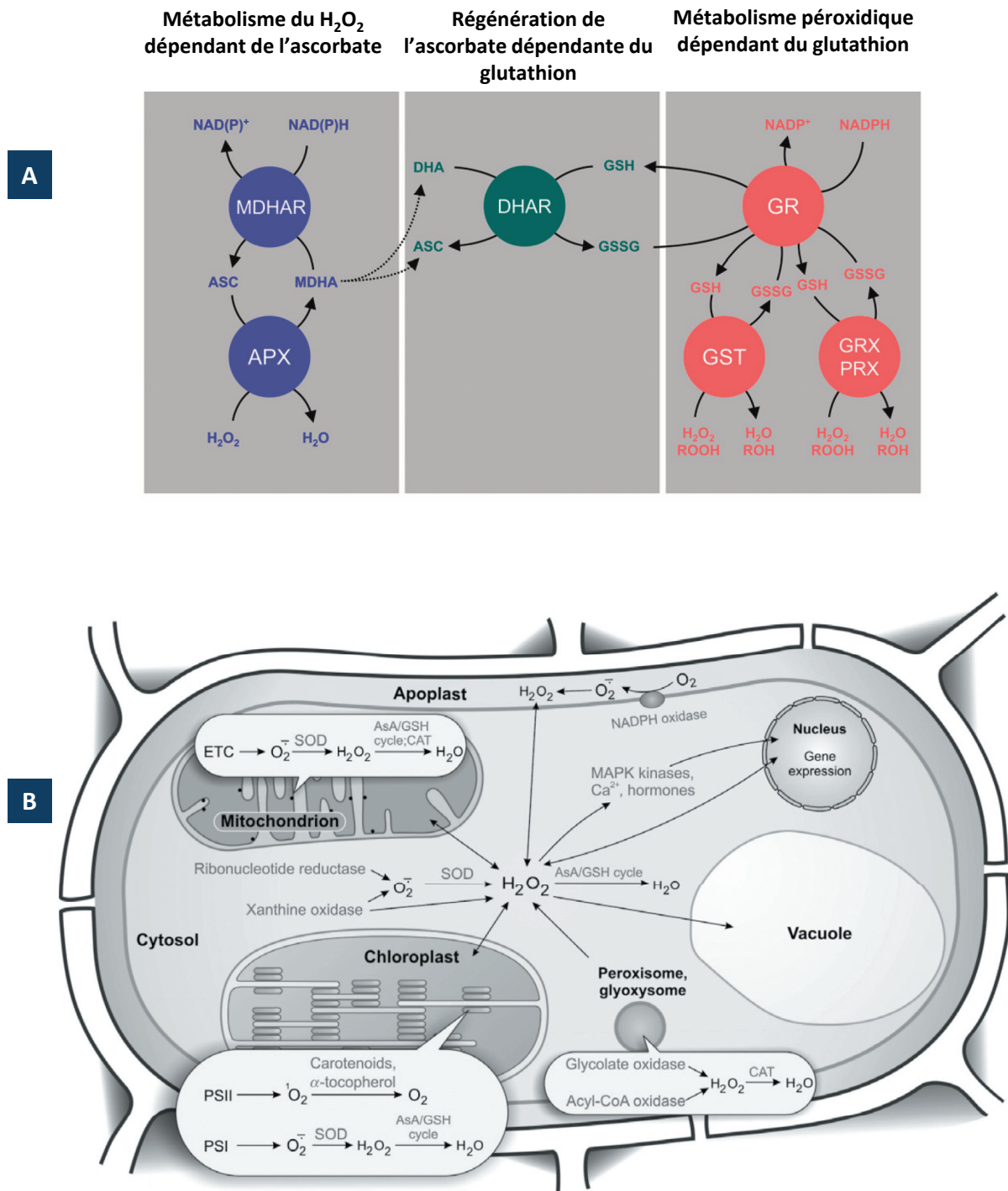
la balance C/N et à une augmentation des niveaux de NAD(H) (Dutilleul *et al.*, 2005). L'arrêt de l'oxydation du NADH par le complexe I dans le mutant *CMSII* entraîne une induction des NAD(P)H deshydrogénases et conduit à un phénotype de plantes riches en N. Celles-ci présentent une augmentation des teneurs générales en acides organiques et acides aminés, en particulier ceux enrichis en N (Dutilleul *et al.*, 2005 ; Hager *et al.*, 2010). En effet, une plus forte assimilation des nitrates est observée chez *CMSII* (Dutilleul *et al.*, 2005 ; Pellny *et al.*, 2008). On retrouve chez les mutants du complexe I d'autres caractéristiques typiques du statut riche en N : répression de la croissance des racines latérales, répartition altérée de la biomasse entre les racines et les parties aériennes en réponse à la disponibilité en N (Pellny *et al.*, 2008).

#### 4. Implication de la biosynthèse du NAD dans le métabolisme C et N

---

La question qui reste en suspens concerne les interactions entre voie de biosynthèse du NAD et assimilation du C et de l'N.

Chez *Arabidopsis thaliana*, NADK2 permet la synthèse de NADP(H) à partir du pool de NAD(H) au sein du compartiment plastidial. L'utilisation de mutants pour cette enzyme a permis de montrer qu'une altération des ratios NADP/NAD affecte la croissance cellulaire (Takahashi *et al.*, 2009 ; Hashida *et al.*, 2009). L'augmentation des niveaux de NADP(H) chez des lignées surexprimant *NADK2* se fait sans modification de la balance NADPH/NADP et mène à une activation coordonnée de la fixation du C et de l'assimilation de l'N. On observe en particulier une activation de l'activité de la rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase, EC 4.1.1.39) et une élévation des niveaux de métabolites azotés, principalement la Gln, le Glu et ses dérivés. Chez les mutants *nadk2*, le pool de NAD(H) est augmenté au détriment du pool de NADP(H) et la forte induction transcriptionnelle de la NR ne s'accompagne pas d'une modification de l'activité extractible. Cette étude doit être repositionnée dans un contexte de limitation en C puisque les plantes sont cultivées en lumière limitante (60  $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ). Chez le riz, la surexpression de la NADK2 d'*Arabidopsis thaliana* permet aussi d'augmenter la teneur en NADP(H) des plantes, sans



**Figure 23. Production et élimination des formes activées de l'oxygène (ROS) chez les plantes.** A : Cycle ascorbate-glutathion. Apoplast : apoplaste ; ASC : ascorbate réduit ; carotenoids : caroténoïdes ; chloroplast : chloroplaste ; Gene expression : expression génique ; MDHA(R) : monodéhydroascorbate (réductase) ; GST : glutathion S-transférase ; Nucleus : noyau ; ROH et ROOH : composés organiques pourvus d'un groupement alcool ou peroxyde, respectivement. D'après [Foyer et Noctor \(2011\)](#). B : Production et devenir métabolique de certains ROS : peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). PSI : photosystème I ; PSII : photosystème II ; ETC : chaîne de transport d'électrons ; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; AsA/GSH : cycle ascorbate/glutathion. D'après [Gadjev et al. \(2008\)](#).

pour autant modifier le niveau des autres nucléotides à pyridine (Takahara *et al.*, 2010). Ces plantes ont des capacités photosynthétiques améliorées (meilleurs transfert d'électron et assimilation du CO<sub>2</sub>).

Les enzymes de biosynthèse du NAD sont elles aussi probablement impliquées dans une régulation du métabolisme azoté. C'est ainsi que l'on observe une induction des gènes de la voie de biosynthèse *de novo* chez le tabac en réponse à une diminution de la disponibilité en N (Hager *et al.*, 2010).

### C. Oxydation du NADPH : cas des NADPH oxydases

---

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production de ROS et les systèmes de détoxication cellulaire comme le cycle ascorbate-glutathion, les thiorédoxines (TRX), les glutathion S-transférases (GST) ou encore les systèmes antioxydants tels que la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD) (Jones *et al.*, 2008 ; Agledal *et al.*, 2010). Ces mécanismes qui limitent la bouffée oxydante, ou détoxifient les ROS, nécessitent le pouvoir réducteur du NADPH. En effet, le NADPH sert à régénérer le GSH (glutathion réduit) à partir du GSSG (glutathion oxydé) par la glutathion réductase (GR) (**Figure 23 A**). Le GSH quant à lui est indispensable au fonctionnement d'enzymes antioxydantes comme la glutathion peroxydase ou les GST (Agledal *et al.*, 2010). Une baisse de l'état de réduction de composés comme l'ascorbate et le glutathion témoigne souvent d'un stress oxydant. Enfin, chez certains types cellulaires, le NADPH est utilisé pour réactiver la CAT après inactivation par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Une autre situation mérite d'être décrite car elle illustre à la fois le rôle du NAD dans le métabolisme rédox et dans des aspects de transduction de signaux moléculaires. Il s'agit de l'oxydation du NADPH avec production de ROS par les NADPH oxydases membranaires (NOX) (Torres *et al.*, 2010) (**Figure 23 B**). Ces enzymes constituent la source principale de la bouffée oxydante apoplastique au cours de nombreuses interactions plante-agent



pathogène (Torres et Dangl, 2005). Historiquement, la NADPH oxydase a été découverte dans les phagocytes de Mammifères où elle permettait l'élimination microbienne (Lambeth, 2004). Il s'agit d'un complexe protéique dont la sous-unité catalytique gp91<sup>phox</sup> est responsable de l'activité oxydase qui transfère les électrons à l'oxygène moléculaire pour former des anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Bien que ces ROS soient particulièrement toxiques, ils n'éradiqueraient pas directement les agents microbiens. Ils induiraient plutôt des variations de pH et de flux ioniques permettant l'activation de protéases responsables de l'élimination microbienne dans les phagocytes (Segal, 2008). Chez les plantes, les NOX portent aussi le nom de RBOH pour *Respiratory Burst Oxidase Homologue* (Torres et al., 2010). Comme chez les Animaux, les gènes *Rboh* végétaux forment une famille multigénique, ce qui suggère des fonctions spécifiques pour les différentes oxydases. La caractérisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana* et de lignées antisens pour les différents gènes *Rboh* a permis d'identifier les membres *AtrbohD* et *AtrbohF* comme impliqués dans la production de ROS en réponse à l'attaque d'agents pathogènes bactériens et fongiques (Torres et al., 2002) ou suite à la perception de motifs moléculaires conservés chez les agents pathogènes (Zhang et al., 2007). Plus précisément, *AtrbohD* serait le responsable principal de la synthèse de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tandis que *AtrbohF* participerait à l'établissement de la mort cellulaire lors de cette interaction (Torres et al., 2002).



## VI. Autres rôles pour le NAD dans la signalisation cellulaire

---

### A. Importance du NAD dans les processus développementaux

---

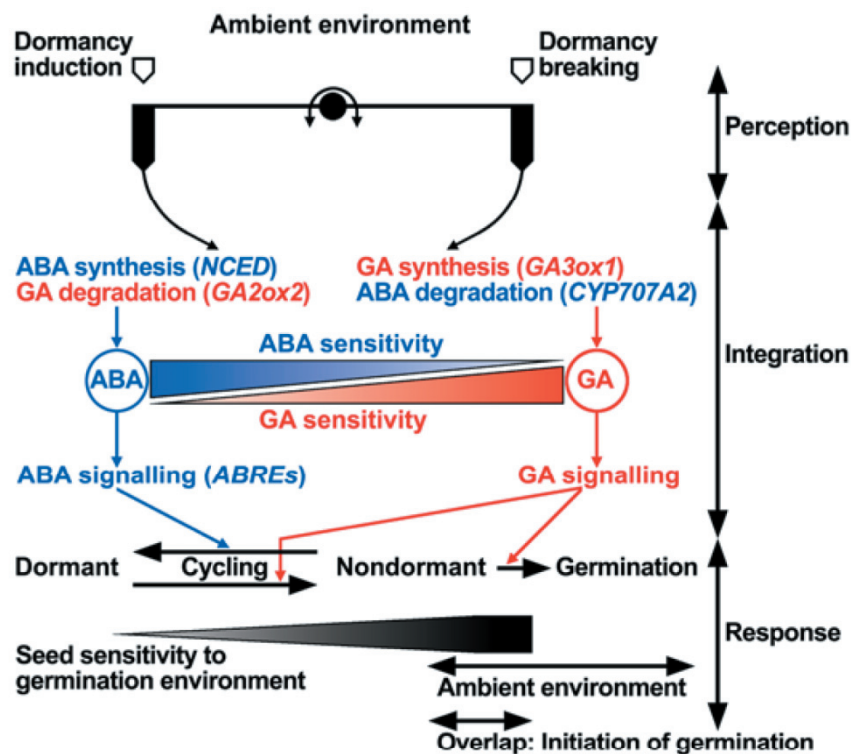
Le développement des plantes est régi par de nombreuses réactions biochimiques liées aux métabolismes énergétique et biosynthétique. Ces événements métaboliques dépendent notamment de cofacteurs essentiels comme le NAD, et d'autres acteurs moléculaires déterminant le statut rédox des cellules végétales (glutathion, ascorbate) (Foyer et Noctor, 2011). Jusqu'à ce jour, le rôle des nucléotides à pyridine dans les processus développementaux végétaux est loin d'être parfaitement décrit et compris. En revanche, des études récentes ont pu apporter des précisions sur l'importance des gènes de biosynthèse du NAD dans le développement des plantes, en particulier dans la physiologie de la germination, la croissance du tube pollinique et la sénescence (Cárdenas *et al.*, 2006 ; Hashida *et al.*, 2007 ; Hunt *et al.*, 2007 ; Schippers *et al.*, 2008).

#### 1. Physiologie de la germination

---

Les graines (ou semences) sont fondamentales pour la reproduction et la diffusion des plantes à fleurs. En raison de leur structure solide et protectrice, elles assurent le développement des plantes malgré les contraintes de l'environnement (froid, sécheresse, etc.). La germination des semences est un processus physiologique complexe contrôlé par de nombreux facteurs exogènes (température, lumière, oxygène) et moléculaires (formes activées de l'oxygène (ROS), phytohormones, etc.) (Koornneef *et al.*, 2002). La dormance, qui se définit par l'inaptitude à germer malgré des conditions environnementales favorables (Bewley, 1997), est induite par l'acide abscissique (ABA) et peut être levée par divers traitements (post-maturation au sec, imbibition au froid) et l'application de certaines molécules (acides gibbérelliques, nitrates, monoxyde d'azote (NO)) (Debeaujon *et*





**Figure 24. La régulation de la dormance et de la germination par l'acide abscissique (ABA) et les gibbérellines (GA) en réponse à l'environnement.** Selon le modèle, des facteurs environnementaux tels que la température affectent la balance ABA/GA et la sensibilité à ces hormones. La synthèse et la signalisation de l'ABA (catabolisme du GA) dominant l'état de dormance (dormancy) alors que la synthèse (synthesis) et la signalisation (signalling) du GA dirigent la transition vers la germination. Les interconnexions complexes entre la synthèse, le catabolisme et la signalisation des phytohormones en réponse à l'environnement peuvent résulter du caractère cyclique (cycling) de la dormance. Une variation de l'intensité de la dormance altère l'entrée en dormance. Lorsque les conditions environnementales chevauchent les conditions de sensibilité, alors la germination est complète. Les gènes clé figurent entre parenthèses. Ambient environment : environnement ambiant ; ABREs : ABA-responsive elements ; Dormancy breaking : levée de dormance ; Dormancy induction : induction de la dormance ; CYP707A2 : cytochrome P450 707A2 impliqué dans le catabolisme de l'ABA ; Initiation of germination : initiation de la germination ; overlap : chevauchement ; NCED : 9-cis-époxy-caroténoïde dioxygénase intervenant dans la biosynthèse de l'ABA ; Nondormant : non-dormant ; Response : réponse ; Seed sensitivity to germination environment : sensibilité des graines à l'environnement germinatif. D'après Finch-Savage et Leubner-Metzger (2006).

Koornneef, 2000 ; Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006) (**Figure 24**). Il existe une étroite relation entre les nucléotides à pyridine et le métabolisme de l'ABA. En effet, les teneurs en NAD pourraient affecter l'activité d'enzymes régulant la biosynthèse de l'ABA à partir des caroténoïdes chez les plantes, comme la xanthoxine déshydrogénase qui nécessite du NAD (González-Guzmán *et al.*, 2002). Le NADPH quant à lui est indispensable à la dégradation de l'ABA catalysée par l'ABA hydroxylase (Kushiro *et al.*, 2004). Contrairement au NADH, le NAD peut inhiber la germination chez *Arabidopsis thaliana* (Hunt *et al.*, 2007). Des avancées récentes dans l'étude de la physiologie de la germination tendent à considérer les ROS comme des acteurs majeurs dans la levée de dormance des graines (Bouteau *et al.*, 2007 ; Bailly *et al.*, 2008 ; Oracz *et al.*, 2009). Par ailleurs, les nucléotides à pyridine maintiennent les pools d'antioxydants cellulaires comme le glutathion et l'ascorbate (Foyer et Noctor, 2011) et les systèmes antioxydants (glutathion réductase, catalase, état rédox GSH/GSSG, **Figure 23 A**) constituent de bons marqueurs cellulaires d'évaluation de la qualité des semences (Bailly *et al.*, 1996 ; Kibinza *et al.*, 2011). Au niveau mitochondrial, le NADH est également impliqué dans la génération de ROS au cours de la respiration cellulaire (De Gara *et al.*, 2010 ; Torres, 2010). La capacité à générer du pouvoir réducteur est centrale pour la germination. En conditions non photosynthétiques, le cycle des pentoses phosphates fournit du NADPH à partir du NADP, fournissant ainsi le pouvoir réducteur nécessaire à l'anabolisme (Kruger et von Schaewen, 2003). En dépit de ces indications, l'implication du NAD dans les mécanismes régulateurs de la germination reste à préciser. Des travaux récents ont corrélé les niveaux de NAD à l'intensité de la dormance dans des graines d'*Arabidopsis thaliana* (Hunt et Gray, 2009). Dans les graines, le ratio NAD/NADP peut varier selon l'écotype d'*Arabidopsis thaliana* considéré. Chez l'écotype Cvi (îles du Cap vert), la maturation des semences entraîne une chute des rapports NAD/NADP, NADH/NADPH et NAD/NADH. En outre, la dormance augmente l'activité de NADP phosphatases au détriment des activités NADK qui chutent, alors que la levée de dormance s'accompagne d'une réduction des niveaux de NAD, sans augmentation des teneurs en NADP.

Plusieurs études se sont intéressées au catabolisme du NAD et à son rôle au cours de l'embryogenèse végétale. Chez les embryons de colza (*Brassica napus*), une étude de traçage par marquage au [carbonyl-<sup>14</sup>C]nicotinamide a montré que le recyclage du NAM vers le

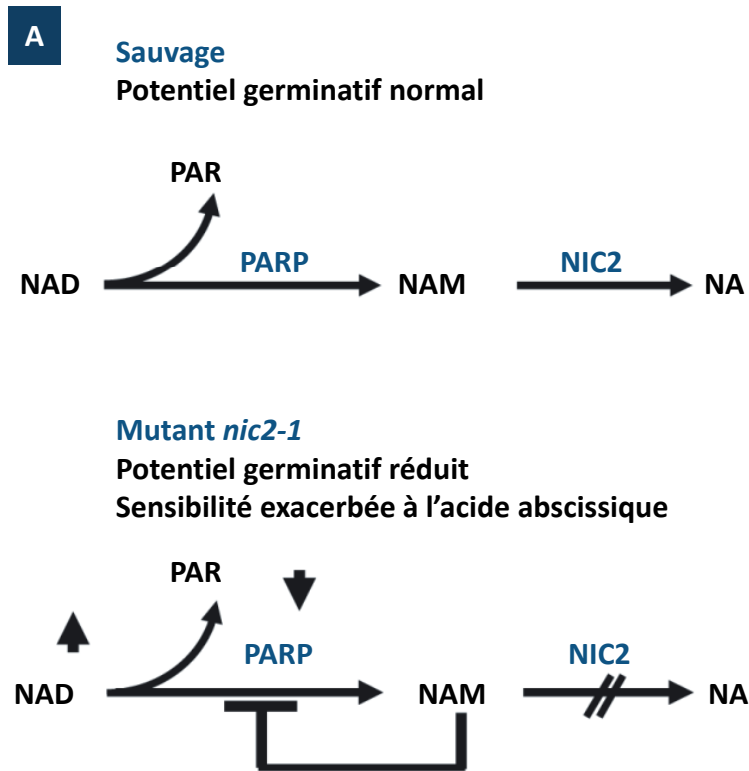
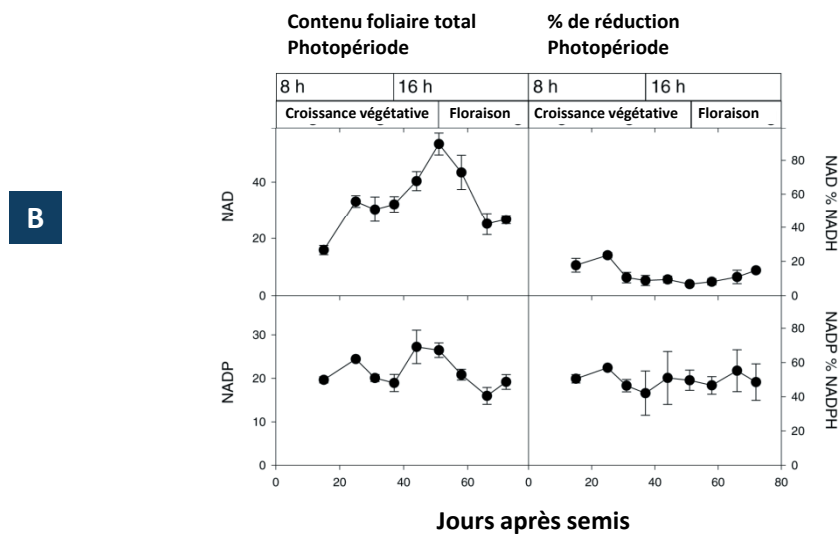
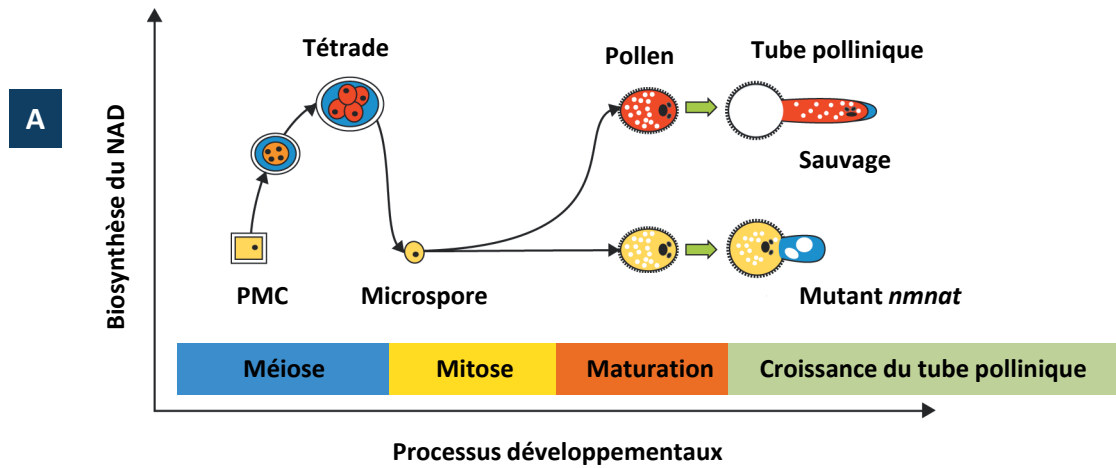


Figure 25. Modèle putatif expliquant les variations de NAD et de polyADP-ribosylation (PAR) observées chez le mutant *nic2-1*. A : synthèse et catabolisme du nicotinamide (NAM) chez les plantes sauvages, et B : chez le mutant *nic2-1* altéré dans la nicotinamidase NIC2. Le symbole  $\text{T}$  indique l'inhibition de l'activité polyADP-ribose polymérase (PARP) et la double barre représente le blocage de la voie métabolique au niveau de NIC2. NA, nicotinate. D'après Hunt *et al.* (2007).

NAD(P) était nécessaire à la croissance lors des étapes initiales de l'embryogénèse, mais également à la fin de la maturation, en préparation au développement post-embryonnaire (Ashihara *et al.*, 2008). Une application de NAM peut également limiter la croissance des vaisseaux vasculaires et inhiber la fermeture ABA-dépendante des stomates (Sugiyama *et al.*, 1995 ; Leckie *et al.*, 1998). D'autres études indiquent que le NAM contrarie la germination chez *Arabidopsis thaliana* (Hunt *et al.*, 2007) ainsi que le développement des embryons de soja (Zheng *et al.*, 2005). Zheng *et al.* (2005) ont également montré que le NAD était recyclé à partir du NAM au cours de la germination. De récentes avancées dans la caractérisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés dans l'activité nicotinamidase suggèrent fortement que ces enzymes interviennent dans la régulation de la germination (Hunt *et al.*, 2007) (**Figure 25**). Alors que l'expression des gènes *NIC1* et *NIC3* est maintenue à un faible niveau au cours du développement de la graine, le gène *NIC2* est très nettement exprimé durant la maturation des semences, ceci corroborant des analyses transcriptomiques publiques disponibles dans la base de données Genevestigator (<http://www.genevestigator.ethz.ch> ; Zimmermann *et al.*, 2004). En outre, le mutant *nic2-1* affecté dans l'activité *NIC2* présente un retard germinatif (restauré par la post-maturation au sec ou la stratification) et reste hypersensible aux traitements NAM et ABA (Hunt *et al.*, 2007). Dans les graines de ce mutant, de faibles niveaux de PAR ont été observés, ainsi qu'un pouvoir germinatif réduit, certainement dû à une diminution de l'activité PARP et des processus de réparation de l'ADN. Ceci est en accord avec le rôle d'inhibiteur du NAM sur les enzymes PARPs. Cette étude suggère que la germination n'est pas régulée par l'ADPR ou le cADPR, bien qu'aucun dosage de ces métabolites n'ait encore été réalisé dans ce contexte physiologique. Les auteurs proposent un modèle de régulation dans lequel la nicotinamidase *NIC2* catalyse la conversion du NAM en NA au cours de la levée de dormance, participant ainsi à un rétrocontrôle positif sur l'activité PARP nécessaire à la réparation de l'ADN. Il a aussi été proposé qu'une légère augmentation du pool de NAD chez le mutant *nic2-1* puisse modifier le rapport NAD/NADH dans les graines déshydratées, ce qui aboutirait à un remaniement des processus biochimiques sous-jacents à la levée de dormance.



**Figure 26. Evolution du pool de nucléotides à pyridine au cours du développement chez *Arabidopsis thaliana*.** A : fluctuation de la biosynthèse du NAD lors de la formation du pollen et de la croissance du tube pollinique. *nmnat* : mutant altéré au niveau de la NaMNAT ; PMC : cellule mère du grain de pollen. D'après Hashida *et al.* (2009). B : Evolution des teneurs en nucléotides à pyridine au cours de la croissance foliaire d'*Arabidopsis thaliana*. D'après Queval et Noctor (2007).

## 2. Développement et sénescence

---

Bien que la répartition du NAD au niveau des organes reste encore assez peu connue, de nombreuses données issues de la littérature indiquent une certaine dynamique dans le pool de nucléotides à pyridine au cours de la croissance des plantes supérieures. Dans les tubes polliniques de *Lilium formosanum*, la mesure de la fluorescence endogène des formes réduites de NAD(P)H indique que le NAD(P)H oscille avec la même période que la croissance du tube, mais en phase opposée (Cárdenas *et al.*, 2006). Des traitements avec des sondes fluorescentes sensibles aux ROS et aux mitochondries montrent que les niveaux de ROS sont corrélés à l'accumulation de mitochondries dans le tube pollinique où la fluorescence du NAD(P)H est maximale. Egalement, l'inhibition des NADPH oxydases conduit à une augmentation de la fluorescence du NAD(P)H et à une perturbation de la croissance du tube pollinique. Des oscillations du NADH ont déjà été observées chez la levure, et constituent un indicateur des variations métaboliques (Ghosh *et Chance*, 1964; Danø *et al.*, 1999). Des fluctuations de la fluorescence peuvent être associées à un décalage entre les formes réduites et oxydées du coenzyme et une synthèse d'ATP concomitante pourrait résulter de niveaux de NAD(P)<sup>+</sup> élevés, favorisant de surcroît la croissance de l'apex du tube (Cárdenas *et al.*, 2006). Par ailleurs, une étude récente basée sur l'analyse de mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés au niveau de l'acide nicotinique adényltransférase (NaMNAT) a montré que cette enzyme était responsable d'une augmentation de la fourniture en NAD au cours de la germination du tube pollinique (Hashida *et al.*, 2007 ; 2009), ce qui suggère que le maintien de la biosynthèse du NAD est également important pour la fertilité du pollen (**Figure 26 A**). Le mutant *nmnat* est léthal à l'état homozygote et présente de sévères anomalies phénotypiques à l'état hétérozygote (Hashida *et al.*, 2007). Des données microarray indiquent en outre une régulation transcriptionnelle des gènes de biosynthèse du NAD dans le grain de pollen (<http://www.genevestigator.ethz.ch> ; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> ; Winter *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter qu'une inhibition pharmacologique des sirtuines (sirtinol) altère la croissance des racines et des tissus vasculaires chez *Arabidopsis thaliana* (Grozier *et al.*, 2001). L'utilisation de composés chimiques a également montré que la désacétylase SIR1 était impliquée dans la transduction du signal auxine (Zhao *et al.*, 2004). L'auxine est une phytohormone régulant de nombreux

Tissue	Line	[NAD <sup>+</sup> ] (nmol g <sup>-1</sup> FW)	[NADH] (nmol g <sup>-1</sup> FW)	Total NAD(H) (nmol g <sup>-1</sup> FW)	[NAD <sup>+</sup> ]/ [NADH]	[NADP <sup>+</sup> ] (nmol g <sup>-1</sup> FW)	[NADPH] (nmol g <sup>-1</sup> FW)	Total NADP(H) (nmol g <sup>-1</sup> FW)	[NADP <sup>+</sup> ]/ [NADPH]
Root	Col-0	6.50 ± 0.56	0.20 ± 0.11	6.70 ± 0.74	31.4 ± 7.2	1.71 ± 0.80	0.30 ± 0.17	2.00 ± 0.39	5.65 ± 2.21
	<i>nic1-1</i>	3.29 ± 1.27	Trace	3.29 ± 0.64	-	1.21 ± 0.55	0.20 ± 0.11	1.41 ± 0.21	6.21 ± 1.56
	CHF2-4	12.0 ± 3.57	0.43 ± 0.25	12.4 ± 3.35	30.0 ± 5.6	1.99 ± 0.94	0.40 ± 0.23	2.39 ± 0.20	5.02 ± 1.25
	MDC8-5	12.4 ± 3.37	0.57 ± 0.33	13.0 ± 3.06	25.8 ± 6.1	1.66 ± 0.72	0.23 ± 0.14	1.88 ± 0.96	7.11 ± 2.87
	Col-0	10.2 ± 2.84	4.48 ± 3.21	14.6 ± 5.72	2.81 ± 0.66	2.79 ± 0.65	Trace	2.79 ± 0.65	-
Rosette leaves	<i>nic1-1</i>	5.84 ± 2.00	2.55 ± 1.80	8.39 ± 3.76	2.58 ± 0.45	1.43 ± 0.15	Trace	1.43 ± 0.15	-
	CHF2-4	15.2 ± 3.12	4.44 ± 1.87	19.5 ± 3.95	3.25 ± 0.70	3.11 ± 0.78	Trace	3.11 ± 0.78	-
	MDC8-5	14.8 ± 2.36	4.31 ± 1.96	18.4 ± 4.21	3.41 ± 0.83	2.95 ± 0.67	Trace	2.95 ± 0.67	-
	Col-0	12.0 ± 4.25	Trace	12.0 ± 4.25	-	3.10 ± 0.28	Trace	3.10 ± 0.28	-
	<i>nic1-1</i>	3.94 ± 1.03	n.d.	3.94 ± 1.03	-	1.95 ± 0.38	Trace	1.95 ± 0.38	-
Cauline leaves	Col-0	11.3 ± 3.38	4.01 ± 2.71	15.3 ± 6.01	3.43 ± ± 0.75	3.58 ± 0.32	Trace	3.58 ± 0.32	-
	<i>nic1-1</i>	5.77 ± 2.74	2.28 ± 1.41	8.05 ± 3.88	3.33 ± 1.14	1.97 ± 0.29	Trace	1.97 ± 0.29	-
	Col-0	27.0 ± 5.07	3.57 ± 3.03	30.6 ± ± 7.16	9.09 ± 3.13	4.50 ± 0.74	0.97 ± 0.34	5.47 ± 0.69	4.04 ± 1.20
Flower	<i>nic1-1</i>	10.0 ± 1.89	1.97 ± 1.34	12.0 ± 2.84	8.79 ± 2.39	1.82 ± 0.29	0.34 ± 0.20	2.16 ± 0.48	3.64 ± 0.66
	Col-0	17.9 ± 4.54	2.79 ± 1.28	20.7 ± 4.82	4.50 ± 1.42	3.77 ± 0.54	0.60 ± 0.10	4.37 ± 0.62	6.42 ± 0.53
Silique	<i>nic1-1</i>	7.97 ± 2.10	1.57 ± 0.76	9.55 ± 2.53	4.93 ± 1.39	1.94 ± 0.51	0.45 ± 0.28	2.40 ± 0.78	5.73 ± 1.50
	Col-0	9.9 ± 1.55	0.94 ± 0.24	10.8 ± 1.65	11.9 ± 2.31	2.02 ± 0.55	0.35 ± 0.11	2.37 ± 0.62	6.02 ± 1.73
Seedlings	<i>nic1-1</i>	7.07 ± 0.37	0.38 ± 0.17	7.45 ± 0.43	13.5 ± 3.56	1.48 ± 0.23	0.33 ± 0.08	1.81 ± 0.27	4.98 ± 1.63
	CHF2-4	11.8 ± 1.41	1.23 ± 0.46	13.0 ± 1.72	9.49 ± 2.01	2.22 ± 0.37	0.42 ± 0.15	2.64 ± 0.46	5.43 ± 1.09
	MDC8-5	10.9 ± 1.70	1.03 ± 0.19	11.9 ± 1.74	11.3 ± 3.05	2.15 ± 0.31	0.39 ± 0.17	2.54 ± 0.40	5.68 ± 2.00

**Figure (Tableau) 27. Teneurs en NAD/P(H) dans différents organes des plantes Col0, du mutant *nic1-1* et de surexpresseurs 35S::AtNIC1.** n.d : non détecté. CHF2-4 et MDC8-5 sont deux lignées 35S::AtNIC1 surexprimant le gène codant pour la nicotinamidase NIC1. Cauline leaves : feuilles caulinaires ; flower : fleur ; line : lignée ; tissue : tissu ; FW : masse fraîche ; root : racine ; rosette leaves : feuilles de rosette ; stem : tige ; seedlings : plantules. D'après Wang et Pichersky (2007).

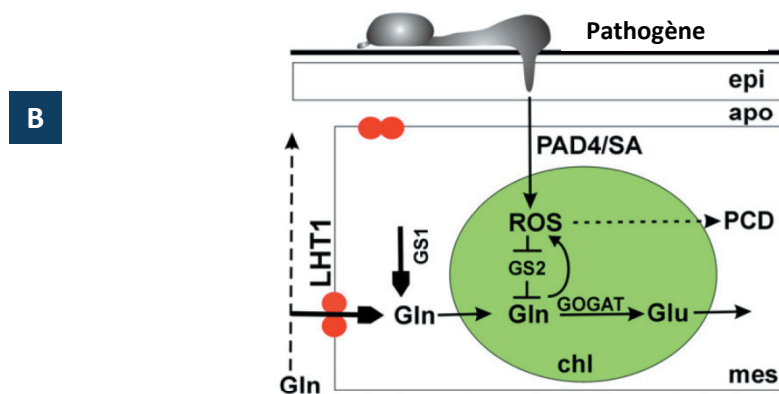
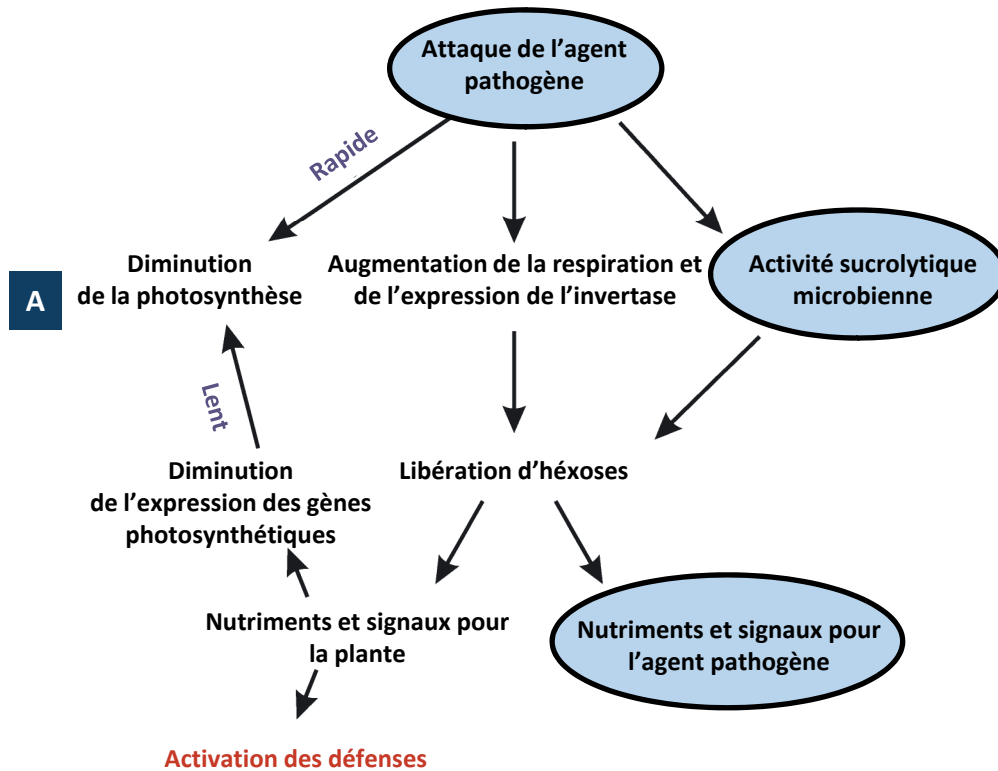
aspects du développement végétal (Gray *et al.*, 2001). Dans ce même contexte de désacétylation, l'enzyme OsSRT1, fonctionnellement proche de SIR2 chez le riz, protégerait le génome des instabilités et cassures de l'ADN, afin d'assurer la croissance des cellules végétales (Huang *et al.*, 2007).

Chez l'épinard, la transition florale s'accompagne d'une déplétion du pool de nucléotides à pyridine (Bonzon *et al.*, 1983). Cette observation supporte l'idée d'une régulation des changements métaboliques NAD-dépendants sous-jacents au passage d'un stade végétatif à reproducteur. Au cours de la croissance des rosettes d'*Arabidopsis thaliana*, des dosages d'antioxydants cellulaires libres montrent que les teneurs en NAD s'accroissent lors du développement végétatif pour s'effondrer ensuite à la floraison (Queval *et Noctor*, 2007) (**Figure 26 B**). En revanche, l'état rédox des nucléotides à pyridine reste stable. Cette dynamique du pool de coenzyme rejoint des travaux plus récents qui rapportent des teneurs en NAD(H) plus importantes dans les fleurs par rapport aux feuilles de rosette ou de la tige de l'écotype Columbia (Col0) d'*Arabidopsis thaliana* (Wang *et Pichersky*, 2007) (**Figure 27**). Cette étude est une des rares qui montrent des dosages de NAD dans les parties racinaires et il est intéressant de noter des valeurs plus faibles dans les racines que dans les parties aériennes. Toutefois, le rapport NAD/NADH, qui varie de 2.81 (feuilles) à 9.09 (fleurs), augmente nettement dans les racines (31.4) (Wang *et Pichersky*, 2007). Il semblerait que la dissociation des métabolismes racinaire et caulinaire s'effectue aussi au niveau de cofacteurs rédox comme le NAD. Dans les organes de stockage des plantes supérieures (albumen, cotylédons), le pool de NAD est essentiellement sous forme oxydée et les niveaux de NADP restent relativement faibles et sous forme réduite (Yamamoto, 1963). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'ensemble du pool de nucléotides à pyridine apparaît oxydé (Wang *et Pichersky*, 2007), contrairement à l'idée selon laquelle le NADP serait préférentiellement réduit (Yamamoto, 1963 ; Heber *et Santarius*, 1965 ; Wigge *et al.*, 1993 ; Wang *et Pichersky*, 2007). Une étude plus fine des pools spécifiques aux compartiments subcellulaires est nécessaire pour lever ce doute. Outre l'état rédox du NAD, des incertitudes subsistent aussi sur l'impact des teneurs en NAD sur les processus développementaux, notamment dans les phénomènes de sénescence, parfois liés aux stress.





Chez la plupart des organismes, la sénescence se caractérise par un déclin des réponses aux changements environnementaux et une perturbation des balances métaboliques, associés à des risques accrus de troubles liés au vieillissement. Chez les plantes, la sénescence aboutit à la mort des feuilles (Lim *et al.*, 2003). Le vieillissement est un processus complexe se déroulant tout au long de la croissance des feuilles, depuis l'initiation foliaire jusqu'à la mort. Il se définit comme une détérioration progressive des fonctions physiologiques et se traduit par des changements transcriptomiques et métaboliques en réponses aux perturbations rédox de la cellule. En effet, plusieurs travaux ont démontré que l'état rédox pouvait constituer un déterminant critique dans l'avènement de la sénescence. Comme chez les Animaux, la sénescence et le vieillissement des plantes sont profondément tributaires des ROS, molécules à l'origine de dégâts cellulaires cumulatifs (Harman, 1956). Une capacité réduite des systèmes antioxydants liés aux cycles de l'ascorbate et du glutathion provoque généralement une accumulation de ROS (Zimmermann et Zentgraf, 2005). En outre, l'oxydation des lipides participe à une élévation des niveaux de ROS *via* les NADP oxydases membranaires (Finkel et Holbrook, 2000 ; Mittler, 2002). A titre d'exemple, un déséquilibre des concentrations en ROS peut être à l'origine du vieillissement des graines et de leur dessiccation. Ce stress oxydant conduit ainsi à une oxydation massive de nombreuses biomolécules, entraînant *in fine* nécrose et mort des tissus (Bailly *et al.*, 2008). Chez le mutant *old5* d'*Arabidopsis thaliana*, la caractérisation récente d'une mutation dans le domaine Cys désulfurase de la quinolinate synthase se traduit par une sénescence précoce (Schippers *et al.*, 2008). Cette perturbation du développement s'accompagne d'une induction des gènes *SAG12* et *SAG13* (*senescence-associated genes*). Curieusement, ces observations s'accompagnent de niveaux stationnaires de NAD élevés qui sont corrélés à des activités exacerbées des enzymes de la voie de recyclage.



**Figure 28. Interconnexions entre le métabolisme primaire et les réactions de défense des plantes.** A : perturbations du métabolisme des sucres au cours de l'infection par des agents pathogènes bactériens virulents. Les éléments cerclés concernent le partenaire pathogène. D'après Berger *et al.* (2007). B : un rôle dynamique du transporteur de lysine et d'histidine LHT1 dans les réponses de défense des plantes. LHT1 apparaît comme un régulateur négatif de la résistance des plantes. Chez le mutant *lht1*, la déplétion du pool de glutamine (Gln) s'accompagne d'un burst oxydatif (ROS) qui aboutit à la mort des cellules (PCD). Apo : apoplaste ; chl : chloroplaste ; epi : cellule de l'épiderme ; GOGAT : Glu synthase ; GS : Gln synthétase ; Glu : glutamate ; mes : cellule du mésophylle. D'après Liu *et al.* (2010).

## B. Rôles du NAD dans la physiologie des stress

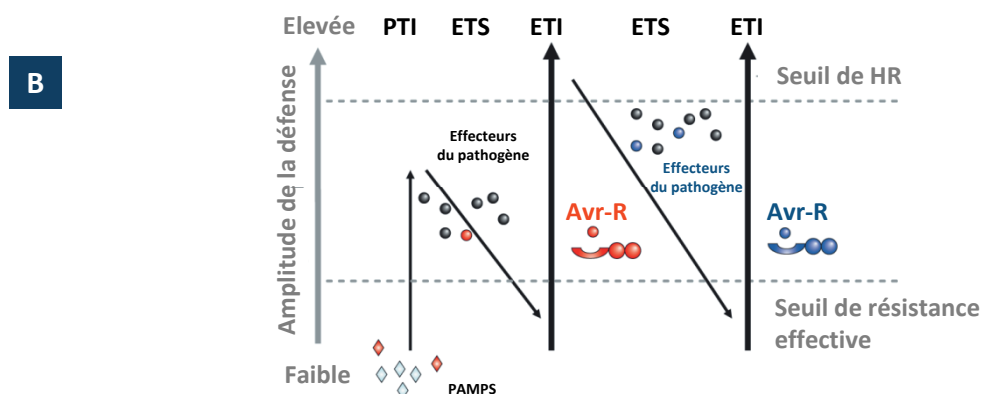
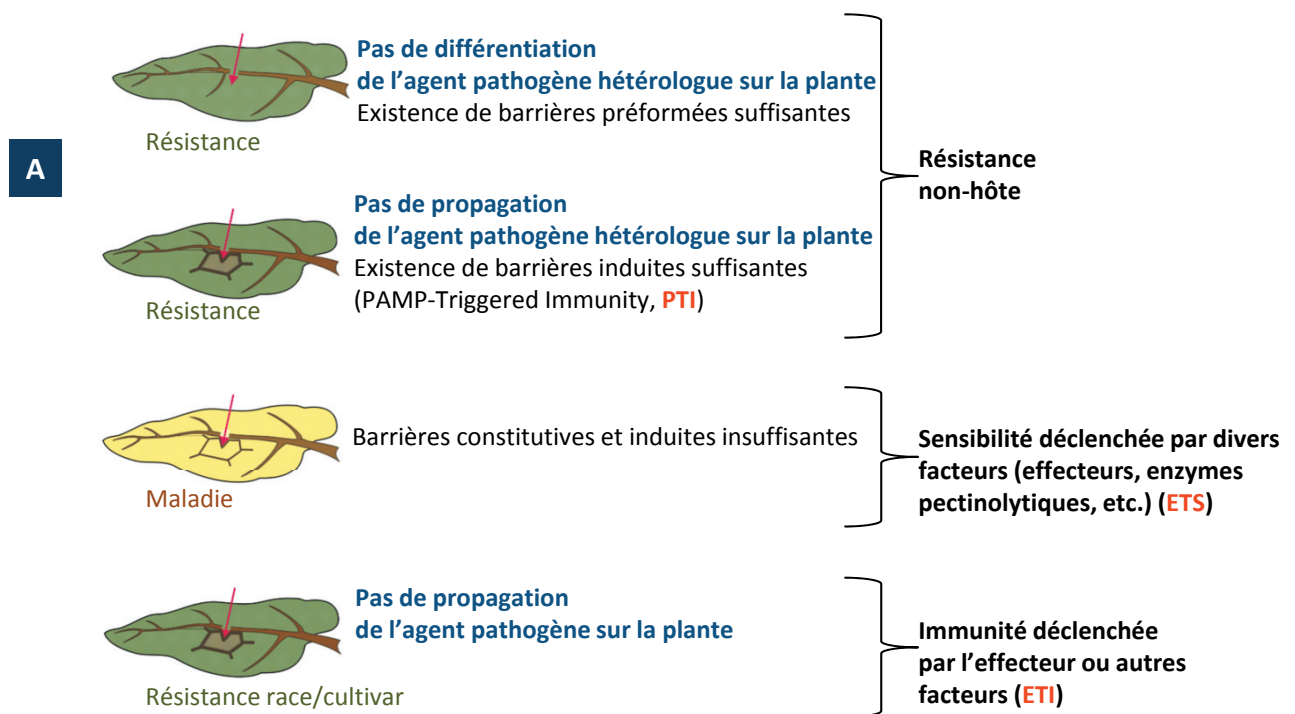
---

### 1. Les réactions de défense des plantes

---

Parmi les nombreuses contraintes environnementales auxquelles les végétaux font face, l'agression par des agents pathogènes bactériens, fongiques ou viraux revêt une importance toute particulière. Les interactions plante-agent pathogène constituent un champ d'étude pertinent au regard des infections qui conduisent à de profonds changements métaboliques pouvant aboutir chez les végétaux à d'importantes pertes, notamment chez les plantes de grandes cultures. Depuis longtemps, le métabolisme secondaire des plantes a retenu l'attention des chercheurs qui ont étudié plusieurs voies métaboliques de défense à l'origine de nombreuses molécules aux propriétés antimicrobiennes (phytoalexines, phytohormones comme l'acide salicylique, glucosinolates, etc.) ou insecticides (nicotine, glucosinolates). Récemment, un intérêt certain a été porté au métabolisme primaire qui apparaît peu à peu comme une des pièces maîtresses sur l'échiquier de la bataille plantes-pathogènes. En effet, une diminution de la photosynthèse et un métabolisme des sucres augmenté constitueraient une réponse générale dans les tissus végétaux infectés (Berger *et al.*, 2007) (**Figure 28 A**). Outre le métabolisme carboné, la caractérisation du mutant *lht1* affecté au niveau du transporteur lysine histidine 1 a permis de mettre en évidence un lien étroit entre l'homéostasie des acides aminés et la réponse d'*Arabidopsis thaliana* aux pathogènes (Liu *et al.*, 2010) (**Figure 28 B**). Cette mutation dans un transporteur d'acide aminé confère un large spectre de résistance aux stress biotiques que les auteurs attribuent non pas à une déplétion du pool global d'intermédiaires azotés, mais plutôt à une carence spécifique en glutamine (Gln).

Les plantes ont élaboré une batterie de stratégies de contre-attaque qui le plus souvent conduit à la survie du végétal, cantonnant le développement de la maladie plus à une exception qu'à une règle. Deux mécanismes conditionnent l'interaction plante-agent pathogène : d'une part le pouvoir pathogène de l'agresseur et d'autre part la capacité de la



**Figure 29. Illustrations des différents types d'interactions plante-agent pathogène et des mécanismes mis en jeu.** A : Aperçu des différents types de réponses immunitaires de la plante. D'après [Nürnberger et al. \(2004\)](#). B : modèle en zigzag illustrant le niveau de défense quantitatif de l'immunité végétale. D'après [Jones et Dangl \(2006\)](#). Dans ce schéma, l'amplitude maximale de la résistance ou de la sensibilité est proportionnelle à la relation [PTI-ETS+ETI]. Dans une première phase, les plantes détectent les PAMPs (losanges rouges) *via* les PRRs ce qui déclenche la PTI (*PAMP-Triggered Immunity*). En phase 2, les agents pathogènes capables de franchir la phase 1 sécrètent des effecteurs qui permettent leur nutrition et leur propagation, ou interfèrent avec le PTI. Il en résulte la sensibilité de la plante connue sous le terme de ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*). En phase 3, un effecteur (en rouge) est reconnu par une protéine NB-LRR, ce qui active l'ETI (*Effector-Triggered Immunity*), version amplifiée du PTI qui passe souvent le seuil d'induction de la HR. En phase 4, des isolats d'agents pathogènes ont été sélectionnés pour avoir perdu l'effecteur reconnu et peut-être pour en avoir gagné de nouveaux, *via* un flux de gène horizontal (en bleu), qui peuvent les aider à supprimer l'ETI. La sélection favorise les nouveaux allèles NB-LRR de plantes capables de reconnaître ces nouveaux effecteurs, il en résulte à nouveau l'ETI.

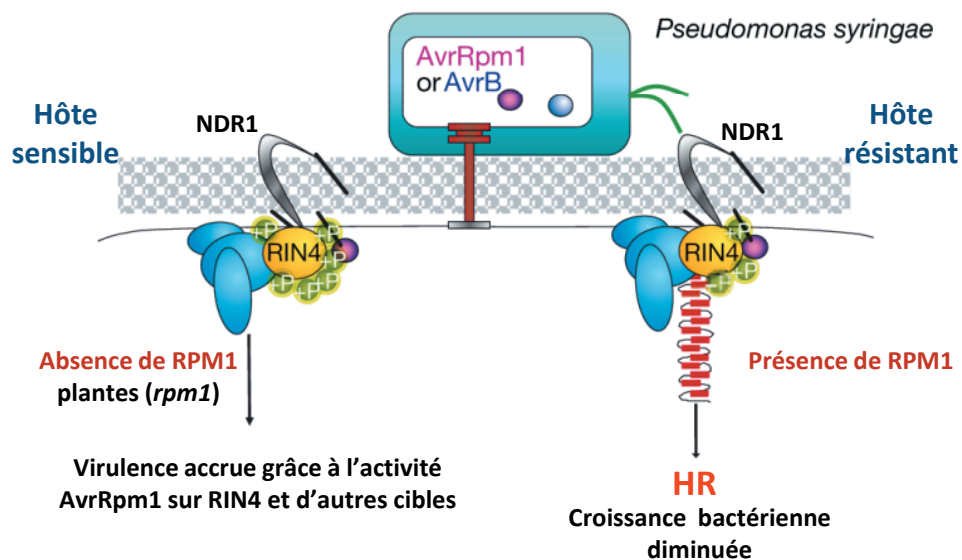
plante à contrecarrer l'infection. On parle de pathosystème pour décrire l'interaction entre une espèce végétale et un agent pathogène. Par ailleurs, les phytopathologistes distinguent différents types de résistance : la résistance non-hôte et la résistance hôte race spécifique. D'une part, on dit qu'une espèce végétale présente une résistance de type non-hôte lorsqu'elle n'est jamais hôte pour un agent pathogène considéré. D'autre part, au sein d'une espèce hôte, certains génotypes peuvent résister à l'infection alors que d'autres sont sensibles. Dans le cas d'un génotype complètement résistant à certaines souches d'un agent pathogène, mais présentant une sensibilité à d'autres souches, la résistance est dite hôte (race) spécifique.

### a) *Résistance non-hôte et reconnaissance non-spécifique*

---

Les agents pathogènes possèdent le plus souvent un spectre d'infection relativement limité : ils se développent sur un nombre restreint d'espèces végétales. La résistance non-hôte repose sur une ligne de défenses constitutives que le microorganisme ne pourra franchir (**Figure 29 A**). Il s'agit en particulier de barrières physiques ou chimiques préformées comme la cuticule des feuilles et des tiges, les cires riches en composés toxiques, les parois cellulaires, la présence de phytoanticipines, etc. (Nürnberger *et al.*, 2004). Il existe également des barrières induites tels les dépôts pariétaux de callose. En outre, la résistance non-hôte ne permet pas à l'agent pathogène, même s'il pénètre la plante, de rencontrer les conditions propices à la réalisation de son cycle d'infection.

Ce type de résistance est très souvent lié à la perception précoce du microorganisme pathogène, évènement critique pour les réponses de défense des plantes (Thordal-Christensen, 2003). Cette reconnaissance qualifiée de non spécifique passe par la perception de molécules désignées sous le terme d'éliciteurs qui peuvent provenir de l'organisme pathogène (éliciteur exogène) ou de la plante elle-même (éliciteur endogène). C'est notamment le cas des fragments de dégradation pariétale libérés à la suite d'action enzymatique du microorganisme. Les éliciteurs sont capables d'induire des modifications



**Figure 30. Illustration d'une reconnaissance gène-pour-gène : l'interaction AvrRPM1-RPM1.** RPM1 est une protéine NB-LRR localisée sur la membrane plasmique périphérique chez *Arabidopsis thaliana*. Elle peut être activée par les effecteurs bactériens AvrRPM1 ou AvrB. Une fois délivrés par le système bactérien de sécrétion de type III (seringue rouge), ces effecteurs sont modifiés par acylation et adressés à la membrane plasmique. Ils vont ensuite cibler la protéine RIN4 qui devient phosphorylée et active dès lors la protéine RPM1 végétale, ce qui déclenche la réponse hypersensible (HR). Dans le cas d'une interaction compatible, les plantes *rpm1* ne possèdent pas de protéine RPM1 fonctionnelle. L'effeteur AvrRpm1 agit vraisemblablement avec RIN4 et d'autres cibles pour stimuler la virulence. En bleu clair sont représentées les protéines non identifiées. D'après Jones et Dangl (2006).

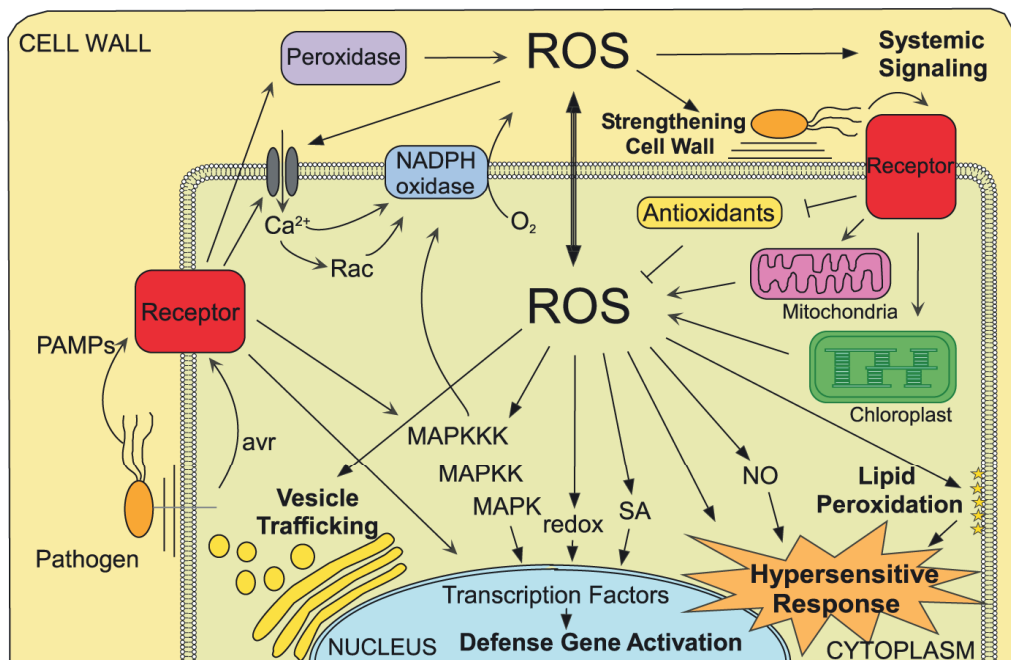
structurales et/ou métaboliques chez le partenaire végétal, sans forcément aboutir à la mort des cellules (Nürnberg *et al.*, 2004) (**Figure 29 B**). Les éliciteurs exogènes, également qualifiés de PAMPs (*Pathogens-Associated Molecular Patterns*) ou de MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*) peuvent être de nature protéique, polysaccharidique, ou lipidique, et sont reconnus par des récepteurs extracellulaires, les *Pattern Recognition Receptors* (PRR) (Zipfel et Felix, 2005 ; Zipfel, 2008). Pouvoir pathogène et survie des microorganismes infectieux sont bien souvent tributaires des PAMPs/MAMPs, et leur perception par les PRR fait appel à la *PAMP-Triggered Immunity* (PTI) chez un grand nombre de plantes (Nürnberg *et al.*, 2004 ; Chisholm *et al.*, 2006) (**Figure 29 B**). La PTI déclenche une ligne de défenses végétales encore appelées non spécifiques. Ces éliciteurs exogènes sont en effet rencontrés chez une multitude d'agents pathogènes. A titre d'exemple, les plantes ont la capacité de percevoir le domaine flg22 de la flagelline des bactéries. Aux PAMPs s'ajoutent des éliciteurs endogènes que les immunologistes viennent de dénommer DAMPs (*Damage-Associated Molecular Pattern*) (Matzinger, 2007). AtPEP1 en est un exemple chez *Arabidopsis thaliana* (Krol *et al.*, 2010).

### *b) La résistance hôte : reconnaissance spécifique et concept d'interaction gène-pour-gène*

---

Un autre degré de spécificité dans les interactions plantes-pathogènes est la résistance hôte (race/cultivar). Les races et les génotypes sont définis selon qu'ils induisent ou non une pathologie. Pour un même pathogène, il peut exister des génotypes végétaux sensibles ou résistants. Il en est de même pour les races d'agents pathogènes, qualifiées de virulentes lorsqu'elles provoquent la maladie et avirulentes lorsqu'elles induisent une résistance chez un certain nombre de génotypes. Le développement des défenses est bien souvent semblable entre des espèces résistantes et sensibles, et diffère principalement dans l'amplitude et la rapidité de mise en place de ces mécanismes (induction de gènes de défense, la biosynthèse de métabolites antimicrobiens, etc.). La résistance hôte repose sur une reconnaissance spécifique génétiquement déterminée entre les deux organismes du pathosystème. C'est au pathologiste américain Harold Henry Flor que l'on doit la





**Figure 31. Le signal ROS au cours des interactions plante-agent pathogène.** La reconnaissance de l'agent pathogène conduit à un burst oxydatif qui joue un rôle clé dans la stimulation des défenses végétales. Les flèches fines indiquent les événements de signalisation intervenant dans la génération de ROS apoplastiques (NADPH oxydase par exemple) et intracellulaires. Les flèches épaisses représentent les fonctions liées aux ROS en relation avec l'activation des réactions de défense des plantes. La double flèche centrale indique le dialogue entre les deux pools de ROS (extra- et intracellulaire). Cell wall : paroi ; Chloroplast : chloroplaste ; Defense Gene Activation : activation des gènes de défense ; Hypersensitive response : réponse hypersensible ; Lipid peroxidation : peroxydation lipidique ; MAPK/KK/KKK : protéine MAP kinase ; Mitochondria : mitochondries ; NO : monoxyde d'azote ; Nucleus : noyau ; PAMPs : motifs moléculaires associés aux pathogènes ; Pathogen : pathogène ; Peroxidase : peroxydase ; Rac : GTPase de type Rac ; Receptor : récepteur ; SA : acide salicylique ; Strengthening cell wall : renforcement de la paroi ; Systemic signalling : signalisation systémique ; Transcription Factors : facteurs de transcription ; Vesicle Trafficking : trafic vésiculaire. D'après [Torres \(2010\)](#).

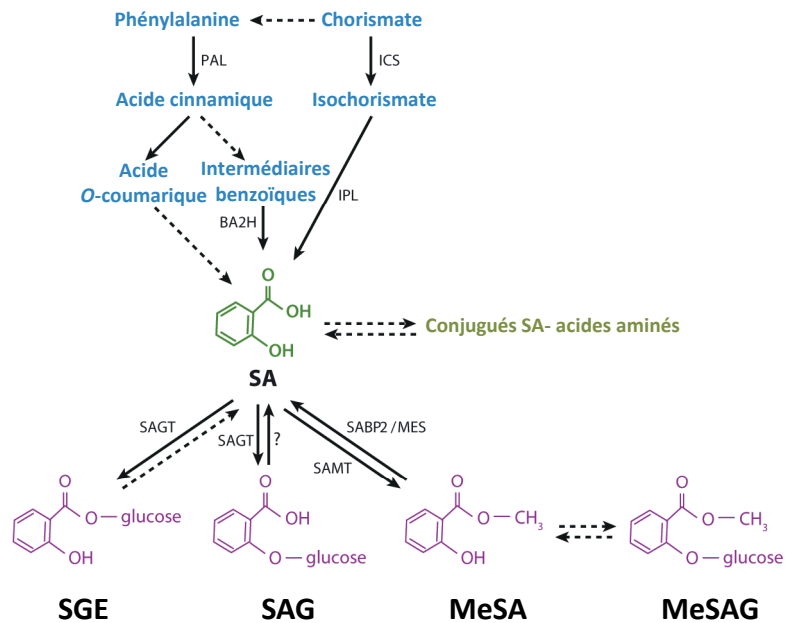
démonstration du caractère monogénique de la résistance spécifique de type race/cultivar (Flor 1955 ; 1971). De ces travaux découle le concept gène-pour-gène selon lequel la présence simultanée et spécifique d'un gène de résistance (*R*) dans le génome d'une plante et d'un gène d'avirulence (*Avr*) correspondant dans le génome d'un agent pathogène conduit à une résistance spécifique qui se traduit souvent par la mort cellulaire programmée des cellules infectées, appelée réponse hypersensible (HR). Dans ce cas précis, il y a reconnaissance spécifique (directe ou indirecte) entre le produit du gène *R* et celui du gène *Avr*. L'interaction est alors considérée comme incompatible (**Figure 29 B**). Les effecteurs de l'agent pathogène reconnus dans le cadre de la résistance race/cultivar déclenchent l'ETI (*Effector-Triggered Immunity*) et on parle d'éliciteurs race-spécifiques pour les produits des gènes *Avr* (**Figure 29**).

Un exemple de ce concept gène-pour-gène est illustré par l'interaction entre le produit du gène *AvrRpm1* et celui du gène *Rpm1* qui implique la protéine RIN4 (*RPM1-interacting protein 4*) d'*Arabidopsis thaliana* (Mackey *et al.*, 2002 ; Gómez-Gómez, 2004) (**Figure 30**). Il s'agit d'une interaction moléculaire de type récepteur/ligand entre plusieurs partenaires protéiques où le facteur d'avirulence *AvrRpm1* entraîne la phosphorylation de la protéine RIN4 qui conduit à une activation subséquente de la protéine R RPM1, déclenchant ainsi la HR (Jones et Dangl, 2006).

### c) Quelques mécanismes mis en place lors d'un stress biotique

---

Lors de stress biotiques, un dialogue moléculaire complexe s'installe, faisant intervenir une multitude de signaux (ROS, acide salicylique, monoxyde d'azote) dans une cascade de signalisation qui aboutit à la HR (Lamb et Dixon, 1997 ; Delledonne *et al.*, 1998 ; Appel et Hirt, 2004). La HR est considérée comme le mécanisme de défense ultime contre les pathogènes, car non seulement elle mène à la mort du tissu infecté, mais déclenche également de façon coordonnée l'activation de nombreuses voies métaboliques et de signalisation : synthèse de phytoalexines et autres métabolites secondaires, bouffée oxydante (*oxidative burst*), induction de gènes de défenses, etc. Immédiatement après la

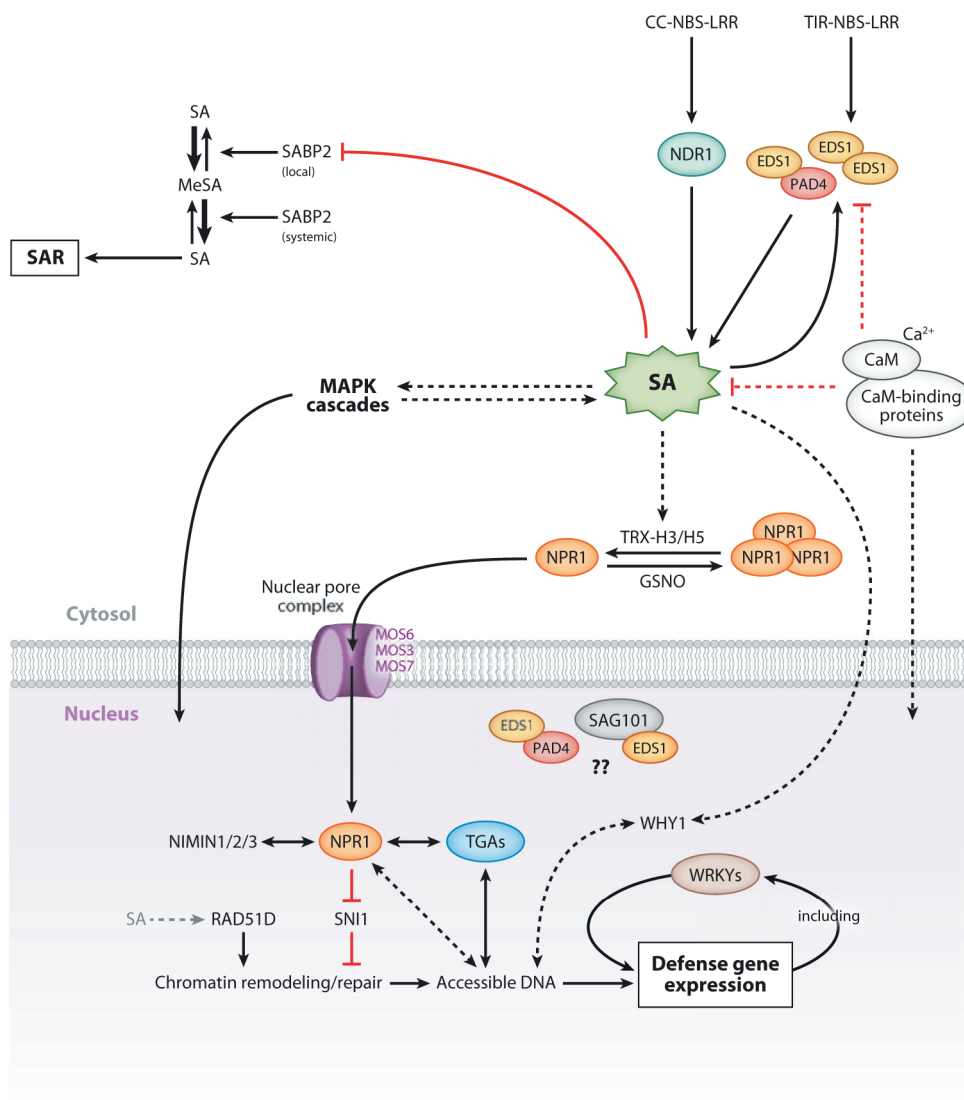


**Figure 32. Vue simplifiée de la biosynthèse et du catabolisme de l'acide salicylique (SA) et de ses conjugués chez les plantes.** BA2H : acide benzoïque-2-hydroxylase ; ICS : isochorismate synthase ; IPL : isochorismate pyruvate-lyase ; MES : méthyle estérase ; MeSA : méthyle salicylate ; MeSAG : méthyle salicylate O-β-glucoside ; PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; SA : acide salicylique ; SAGT : SA glucosyltransférase ; aa : acide aminé ; SAMT : SA méthyltransférase ; SABP2 : protéine de liaison au SA ; SGE : salicyloyle glucose ester ; SAG : SA O-β-glucoside. D'après [Vlot et al. \(2009\)](#).

perception de l'agent pathogène, des événements précoces vont impliquer des flux ioniques (notamment calciques), des processus de phosphorylation-déphosphorylation faisant intervenir des protéines kinases-phosphatases, l'activation de phospholipases et de protéines G, ou encore la formation de ROS (**Figure 31**).

Nombre de travaux scientifiques ont démontré l'importance de l'acide salicylique (acide *O*-hydroxybenzoïque, SA) comme phytohormone de signalisation largement impliquée dans les réponses de défense des plantes, telles que la mise en place des résistances acquises locale (LAR) et systémique (SAR), ou encore la mort cellulaire programmée (Delaney *et al.*, 1995 ; Sticher *et al.*, 1997). En sus d'une accumulation de SA lors de la SAR, une bouffée oxydante et l'induction des gènes *PR1*, *PR2*, *PR5* dits *Pathogen Related (PR)* sont observées (Malamy *et al.*, 1990 ; Ryals *et al.*, 1996). Cette réponse systémique acquise s'accompagne notamment d'une résistance à un large spectre d'agents pathogènes (Durrant et Dong, 2004 ; Ryals *et al.*, 1996). A l'inverse, la SAR est inhibée dans des plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques *NahG* qui surexpriment le gène *nahG* codant une salicylate hydroxylase qui catabolise le SA en catéchol (Delaney *et al.*, 1994).

D'un point de vue métabolique, il semble que le SA ne dérive pas d'un seul intermédiaire de biosynthèse. Sa production chloroplastique engage différentes voies (Métraux, 2002 ; Vlot *et al.*, 2009) : deux à partir de la phénylalanine (Phe) et une autre à partir du chorismate (précurseur de la Phe issu de la voie du shikimate) *via* l'isochorismate synthase (EC 5.4.4.2) codée par le gène *Isochorismate Synthase 1 (ICS1)* (Wildermuth *et al.*, 2001) (**Figure 32**). Le mutant d'*Arabidopsis thaliana sid2 (SA induction deficient)*, chez lequel l'activité ICS1 est altérée, présente des niveaux de SA extrêmement faibles après infection, alors qu'une induction locale et systémique du gène *ICS1* a été montrée chez des plantes sauvages infectées par différents organismes pathogènes. Ces observations suggèrent fortement qu'au cours de l'infection le SA produit par la voie du chorismate est nécessaire à l'établissement de la résistance. Peu de données en revanche sont disponibles concernant les éléments de la transduction du signal menant à la résistance SA-dépendante. En aval du SA se situe la voie NPR1 (*non expressor of PR genes 1*) qui fait intervenir la protéine éponyme (Shah, 2003 ; Dong, 2004 ; Pieterse et van Loon, 2004). L'induction de certains gènes *PR* est

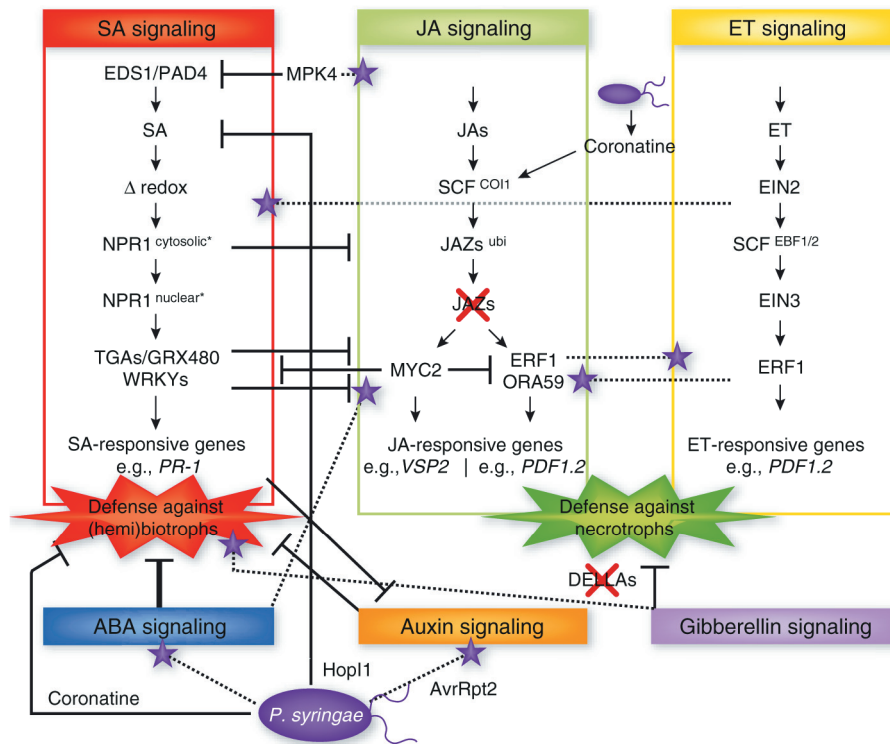


**Figure 33. Représentation schématique de la voie de signalisation du SA au cours des réponses de défense des plantes.** Les flèches indiquent l'activation d'activité enzymatique, l'induction ou l'accumulation de composés ou de transcrits. Dans le cas de NPR1, la flèche illustre la translocation du monomère NPR1 dans le noyau. Les doubles flèches indiquent des interactions physiques protéine-protéine ou protéine-ADN. Les lignes rouges représentent des inhibitions d'activités enzymatiques ou d'accumulation de molécules. Les traits pleins indiquent des interactions bien établies alors que les pointillés représentent des interactions hypothétiques ou moins bien caractérisées. Enfin, les pointillés gris indiquent une activation directe ou indirecte de RAD51D par l'acide salicylique (SA). Accessible DNA : ADN accessible ; CaM-binding proteins : protéines liant la calmoduline ; Chromatin remodeling/repair : Remodelage/réparation de la chromatine ; Defense gene expression : expression des gènes de défense ; Including : incluant ; MeSA : méthyle SA ; Nuclear pore complex : complexe du pore nucléaire ; Nucleus : noyau ; SABP : protéine de liaison au SA ; SAR : résistance systémique acquise ; Systemic : systémique. Les autres termes abrégés représentent des protéines impliquées dans la transduction du signal du SA. D'après *Vlot et al. (2009)*.

tributaire de cette protéine (*i.e.* PR1 et PR2, Kinkema *et al.*, 2000). Le mutant d'*Arabidopsis thaliana* *npr1* témoigne d'une SAR fortement perturbée et présente une susceptibilité à différents organismes pathogènes (Glazebrook, 1999). Des travaux menés chez la plante modèle ont montré que la résistance à certains virus était abolie chez les plantes *NahG* mais non pas chez les mutants *npr1*, suggérant ainsi l'existence d'une voie SA-dépendante NPR1-indépendante. Desveaux *et al.* (2004) ont proposé que cette voie nécessiterait l'activation de facteurs de transcription de type WHIRLY (WHY ; **Figure 33**). Il semblerait également que l'état rédox cellulaire joue un rôle sur le devenir de NPR1 (Mou *et al.*, 2003). Cette protéine se retrouve à l'état d'oligomère. Suite à la réduction de ces ponts disulfures, NPR1 devient monomérique, entraînant sa translocation dans le noyau où elle active la transcription de gènes de défenses (Kinkema *et al.*, 2000 ; Fan et Dong, 2002 ; Johnson *et al.*, 2003 ; Tada *et al.*, 2008) (**Figure 33**). Enfin, NPR1 peut interagir avec NIMIN1 (*NPR1/NIM1-interacting 1*), qui joue un rôle possible dans les mécanismes d'activation de la SAR (Weigel *et al.*, 2005).

En complément de la voie de signalisation du SA, l'implication d'une voie de signalisation lipidique a été proposée, qui fait intervenir le jasmonate (JA) et l'éthylène (ET) (pour revue voir Farmer et Ryan, 1990 ; Broekaert *et al.*, 2006 ; Wasternack et Kombrink, 2010). Ces deux phytohormones sont étroitement liées à l'activation de mécanismes de défenses chez les végétaux (**Figure 34**). Elles fonctionneraient en synergie, en induisant des gènes de défenses chez *Arabidopsis thaliana* (*PDF1.2*) (Xu *et al.*, 1994 ; Penninckx *et al.*, 1998). En outre, chez les mutants *jar1* et *etr1*, respectivement déficients dans la réponse au JA et à l'ET, la résistance systémique induite, appelée ISR pour *Induced Systemic Resistance*, est compromise, alors qu'elle se met en place dans les lignées *NahG* (Pieterse *et al.*, 1998).

Il existe ainsi des interconnexions complexes entre différents signaux moléculaires impliqués dans le stress biotique. Des synergies et/ou antagonismes sont notamment possibles (**Figure 34**). Les phytohormones jouent un rôle clé, mais se superposent aussi les signalisations par les ROS, le NO (**Figure 31**) et très certainement les nucléotides à pyridine.



**Figure 34. Interconnexions entre les différents signaux moléculaires impliqués dans les stress biotiques.**

Les régulations positives sont représentées par des pointillés suivis d'une étoile violette. Les traits rouge terminés par une barre rendent compte des effets négatifs. ABA : acide abscissique ; Against (hemi)biotrophs/necrotrophs : contre les (hemi)biotrophes/nécrotrophes ; COI1 : coronatine insensitive 1 ; EDS: enhanced disease susceptibility ; e.g. : par exemple ; EIN : ethylene insensitive ; ET : éthylène ; GRX : glutarédoxine ; JA : acide jasmonique ; JAZ : jasmonate ZIM-domain ; MPK4 : mitogen-activated protein kinase 4 ; NPR1 : non expressor of PR genes ; PAD4 : phytoalexin deficient 4 ; PDF1.2 : plant defensin 1.2 ; PR : pathogenesis-related ; responsive genes : gènes répondant à/au ; SA : acide salicylique ; Signaling : signalisation. D'après Pieterse *et al.* (2009).

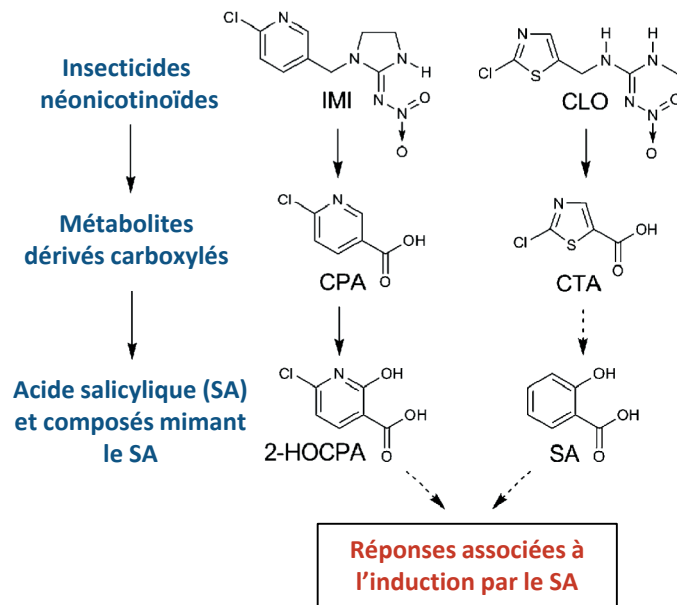
## 2. Le NAD, molécule signal dans les réponses de défense des plantes

---

Les avancées scientifiques permettent aujourd'hui de dresser un tableau relativement précis des mécanismes de défense développés par les végétaux lors d'attaques microbiennes. C'est également dans ce contexte que des travaux récents précisent le rôle du NAD dans l'immunité des plantes puisque les nucléotides à pyridine sont à l'interface des métabolismes primaire et secondaire et occupent une place de choix dans la signalisation.

Le catabolisme et le recyclage des dérivés du NAD sont des événements métaboliques importants pour la réponse des plantes aux agents pathogènes. Le NAD est connu pour son implication dans la synthèse d'alcaloïdes à pyridine, molécules aux propriétés toxiques et anti-appétantes (nicotine, anabasine, ricinine, etc.) (Noctor *et al.*, 2006). La blessure des feuilles chez *Nicotiana*, qui s'apparente à une mastication par les herbivores, induit une forte accumulation de nicotine (Sinclair *et al.*, 2000). En outre, l'isonicotinamide est un analogue structural du NAM comprenant le résidu nicotinate présent dans certains inducteurs de la SAR (Schneider *et al.*, 1996). Dans les cultures cellulaires de tabac, l'application d'isonicotinamide induit l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et l'accumulation de composés secondaires phénoliques et sesquiterpéniques (Louw et Debery, 2000). De même, les néonicotinoïdes constituent une classe d'insecticides puissants dont le mode d'action est proche de la nicotine, insecticide naturel, agissant sur le système nerveux central des Insectes, mais avec une faible toxicité chez les Mammifères. Chez les Insectes, les néonicotinoïdes entraînent une paralysie menant en quelques heures à la mort. Chez les plantes en revanche, ces molécules potentialisent la tolérance aux pathogènes d'origine microbienne (Thielert *et al.*, 2006 ; 2009). Egalement, des rosettes d'*Arabidopsis thaliana* pulvérisées avec des néonicotinoïdes témoignent d'une résistance accrue à l'agent pathogène de l'oïdium (*Erysiphe graminis*), en corrélation avec une induction des réponses de défense dépendantes du SA (Ford *et al.*, 2010) (Figure 35). Il est intéressant de souligner qu'en conditions de non infection par les



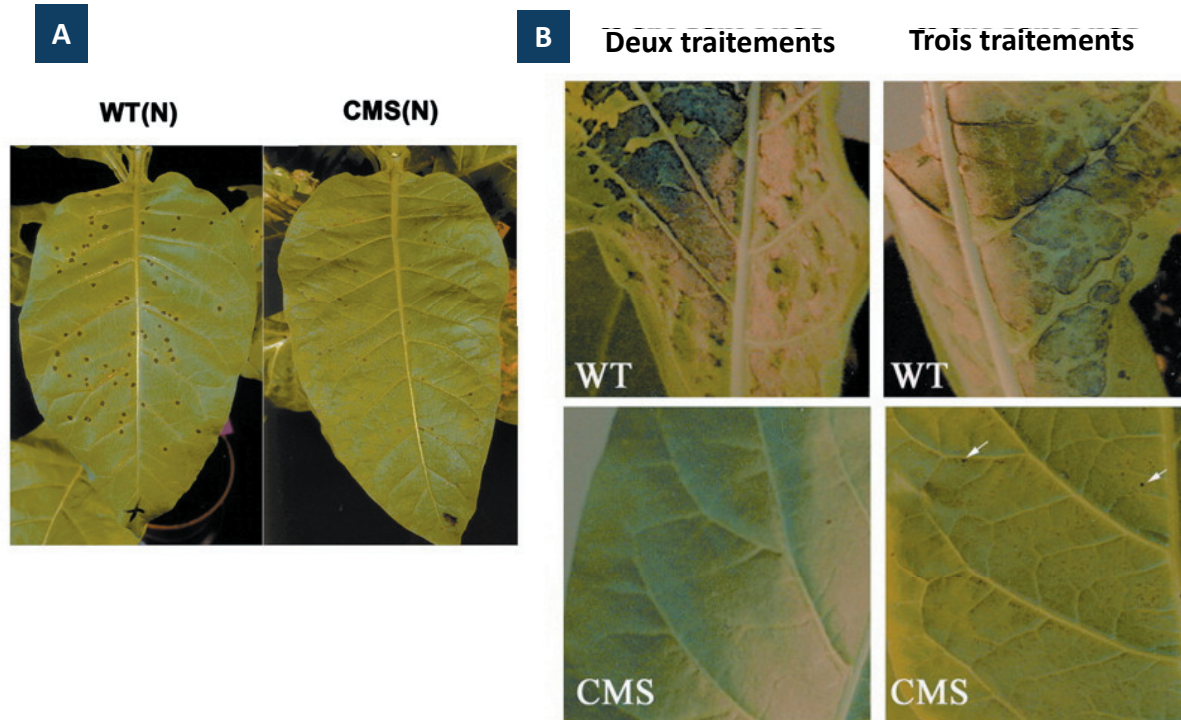


**Figure 35. Certains néonicotinoïdes miment les réponses de défense associées au SA.** L'imidaclopride (IMI) et la clothianidine (CLO) sont deux insecticides dérivés du NAD. Ils sont transformés *in planta* en dérivés carboxylés : les acide 6-chloropyridinyl-3-carboxylique (CPA) et 2-chlorothiazolyl-5-carboxylique (CTA). Ces molécules induisent des réponses de défense similaires à celles induites par l'acide salicylique (SA). Le CPA pourrait agir *via* un dérivé, le 2-HOCPA, qui mime le SA, alors que le CTA induirait la biosynthèse du SA. Les traits pleins indiquent la formation d'un métabolite et les pointillés représentent l'induction d'une voie de biosynthèse. D'après [Ford et al. \(2010\)](#).

Insectes, les néonicotinoïdes favorisent la croissance foliaire, la vigueur des plantes et la tolérance au stress hydrique (Ford *et al.*, 2008).

Lors d'attaques pathogènes, le NAD semblerait cibler certains mécanismes intervenant dans son catabolisme. Par exemple, une stimulation des processus d'ADP-ribosylation est remarquée lorsqu'*Arabidopsis thaliana* est infectée par la souche *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) avirulente *Pst-AvrRpt2+* (Adams-Phillips *et al.*, 2010). Les auteurs proposent que l'utilisation du NAD (dégradation) interviendrait dans des processus de réparation de l'ADN en conditions de stress. Par ailleurs, la sirtuine *AtSRT2* régulerait négativement les défenses basales contre la souche virulente *Pst DC3000*, probablement en perturbant la biosynthèse du SA (Wang *et al.*, 2010). L'infection par *Pst DC3000* conduit à une répression SA-dépendante de l'expression d'*AtSRT2*. Le mutant homozygote *srt2* témoigne d'une plus grande résistance bactérienne, corrélée à l'induction de *PR1*, alors que la surexpression d'*AtSRT2* entraîne une sensibilité accrue à la bactérie et une activation de *PR1* contrariée. Des données transcriptomiques révèlent dans le fond génétique *srt2* l'induction de gènes liés à la biosynthèse du SA (*PAD4*, *EDS5* et *SID2* ; voir **Figure 33**). A l'inverse, les mêmes gènes sont sous-exprimés dans les lignées qui surexpriment le gène *AtSRT2* (Wang *et al.*, 2010).

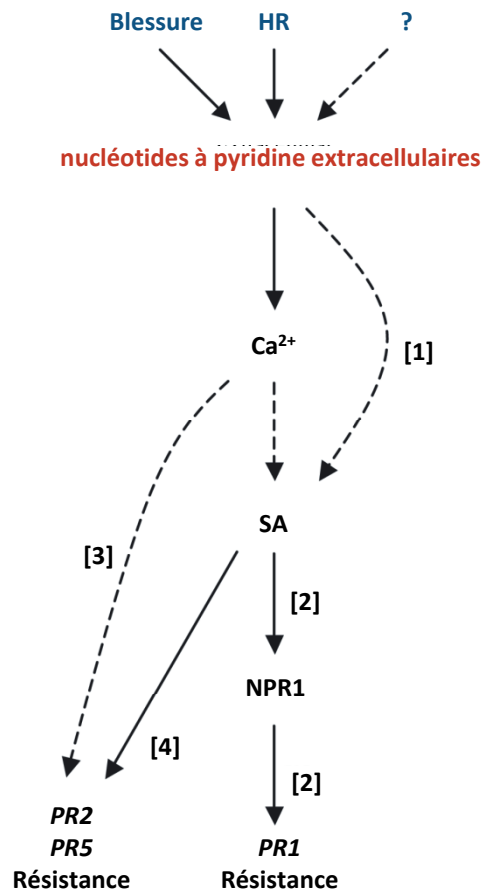
Dans le cadre de diverses interactions plante-agent pathogène, les phytopathologistes se sont intéressés à l'homéostasie des nucléotides à pyridine et une perturbation de leur métabolisme a souvent été constatée. En 1968, Ryrie et Scott rapportaient déjà un enrichissement en NAD six jours après infection de feuilles d'orge avec l'agent pathogène de l'oïdium *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (Ryrie et Scott, 1968). Plus récemment, une expression différentielle du gène *AtNADK-1* a été rapportée chez *Arabidopsis thaliana* en conditions compatible et incompatible avec la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Berrin *et al.*, 2005). Chez le mutant mitochondrial *CMSII*, les niveaux élevés en NAD(H) sont corrélés à une résistance au virus de la mosaïque du tabac, certainement en raison d'effets pléiotropes (Dutilleul *et al.*, 2003) (**Figure 36**). En outre, une application exogène de nucléotides à pyridine induit l'expression de gènes *PR* et l'accumulation du pool de SA libre, conduisant à une résistance d'*Arabidopsis thaliana* à la



**Figure 36. La résistance du mutant *CMSII* à l'infection virale et à l'ozone.** A : réponse hypersensible occasionnée par l'infection avec la souche U1 du virus de la mosaïque du tabac (TMV) chez l'hybride *Nicotiana sylvestris* x *Nicotiana tabacum* porteur du gène *N* de résistance en fond sauvage (wild type : WT) ou *CMSII* (CMS). L'inoculation a été réalisée sur des feuilles de plantes en stade pré-floral avec  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de virus. Les photographies ont été prises sept jours après inoculation. B : abondance relative et taille des lésions nécrotiques développées chez des plantes de *Nicotiana sylvestris* sauvage (WT) ou *CMSII* après deux ou trois traitements à l'ozone. Seules les plantes WT présentent de sévères dégâts. Les flèches blanches indiquent des zones de nécrose chez *CMSII* après le troisième traitement. D'après [Dutilleul et al. \(2003\)](#).

bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 (Zhang et Mou, 2009). Les mécanismes faisant intervenir le NAD dans la signalisation SA n'en demeurent pas moins élusifs. En effet, les auteurs ont montré que le NAD extracellulaire induisait à la fois les voies dépendante et indépendante de NPR1 (*non expressor of PR genes 1*) (Figure 37). Les auteurs se sont également intéressés au rôle des NOX AtRBOHD et AtRBOHF responsables de la bouffée oxydante en contexte infectieux chez *Arabidopsis thaliana* (Torres et al., 2002). L'analyse des mutants *atrbohD* et *atrbohF* montrent que l'induction des gènes *PR1*, *PR2* et *PR5* en réponse à l'application extracellulaire de nucléotides à pyridine est indépendante de ces deux enzymes productrices de ROS (Zhang et Mou, 2009). Il apparaît également que le pouvoir réducteur du NADPH n'est pas à l'origine de l'induction de l'expression de gènes *PR* observée par Zhang et Mou (2009). Cette réponse transcriptomique serait plutôt médiée par la signalisation calcique. En effet, une chélation des ions  $Ca^{2+}$  abolit l'induction de l'expression des gènes *PR* suite au traitement exogène de NAD(P).

Une autre interconnection entre l'homéostasie des nucléotides à pyridine et le système immunitaire des plantes se situe au niveau des NUDX qui dégradent le NAD (Hashida et al., 2009). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* code 24 membres de la famille NUDX (Ogawa et al., 2005). Bien que les fonctions biologiques de ces enzymes soient peu connues, la protéine NUDT7 possédant un domaine NUDX apparaît comme un composant régulé par de nombreux stress dont biotiques. Le mutant homozygote *atnudt7-1* est plus résistant à l'infection par *Pseudomonas syringae* (Jambunathan et Mahalingam, 2006). Par ailleurs, le gène *NUDT7* a été identifié comme gène de réponse aux agents pathogènes dont l'expression est dépendante des voies de signalisation EDS1 et PAD4 (voir Figure 33) (Bartsch et al., 2006). Les auteurs ont également montré que le mutant *atnudt7-1* est plus résistant à l'agent pathogène *Hyaloperonospora parasitica* et que la stimulation de la résistance nécessite une protéine EDS1 fonctionnelle. Il est intéressant de noter que le mutant *atnudt7-1* présente une croissance retardée, un rapport NAD/NADH perturbé en conditions de faible apport nutritionnel et l'induction de gènes liés à la SAR (Jambunathan et al., 2010). Ge et al. (2007) ont également montré que la mutation *atnudt7-1* entraînait l'induction de gènes dépendants et indépendants de la voie NPR1 et de l'accumulation de SA. Cette étude propose qu'une perturbation de l'état rédox cellulaire à travers un pool élevé de NADH



**Figure 37. Modèle d'étude des voies de signalisation activées par l'application extracellulaire de nucléotides à pyridine.** Le NAD(P) fuit vers le compartiment extracellulaire (ECC) lors de la réponse hypersensible (HR) induite par une attaque pathogène. Les points d'interrogation indiquent les sources non connues de NAD(P) extracellulaire : eNAD(P). Le eNAD(P) stimule l'influx calcique et l'accumulation d'acide salicylique (SA). La connexion entre l'accumulation de SA et la signalisation calcique reste évasive. Le eNAD(P) pourrait court-circuiter l'influx calcique pour activer la voie de signalisation du SA [1]. Le eNAD(P) active non seulement la voie dépendante du SA et de NPR1 (*non expressor of PR genes 1*) [2], mais également la voie indépendante du SA et de NPR1 [3] ainsi que la voie dépendante du SA et indépendante de NPR1 [4]. Les pointillés indiquent de possibles évènements de signalisation. *PR* : gènes de réponse aux agents pathogènes. D'après Zhang et Mou (2009).

stimulerait les réactions de défense alors que NUDT modèrerait ces mécanismes immunitaires pour éviter une stimulation excessive (Ge *et al.*, 2007). En complément de ces indications, la caractérisation d'un mutant *knock-out* affecté dans le gène de NUDX *Growth Factor 1* met en évidence des niveaux élevés de ROS et de NADH conduisant à une tolérance accrue à des pathogènes bactériens virulents (Jambunathan et Mahalingam, 2006). En somme, de ces observations découlent un rôle potentiel de régulateur négatif pour les NUDX dans les réactions de défenses des plantes.

### 3. NAD et rhizosphère

---

Hors études phytopathologiques, très peu d'auteurs ont pris en considération le rôle physiologique des enzymes de biosynthèse du NAD dans les phénomènes symbiotiques. Une seule étude démontre un rôle pour la QPT dans la promotion de la croissance des plantes par la souche PsJN de *Burkholderia sp.* (Wang *et al.*, 2006). Cette conclusion se base sur une approche de mutagenèse montrant qu'une complémentation par la QPT et une supplémentation par du NaMN (produit de la QPT) restaure une capacité altérée à promouvoir la croissance végétale.

### 4. NAD et tolérance aux stress abiotiques

---

De nombreux travaux menés chez les plantes ont montré qu'une manipulation du métabolisme du NAD participait à la résistance des végétaux à certains stress abiotiques (De Block *et al.*, 2005 ; Noctor *et al.*, 2006). En effet, il semblerait que des altérations du pool de NAD et de ses dérivés modulent le métabolisme primaire et secondaire des plantes en conditions de stress (Mahalingam *et al.*, 2007 ; Takahara *et al.*, 2010). Lors de contraintes environnementales, les plantes sont très souvent victimes de stress oxydant dit *secondaire*, notamment en réponse au froid (Prasad *et al.*, 1994 ; Xiong *et al.*, 2002), au stress lumineux

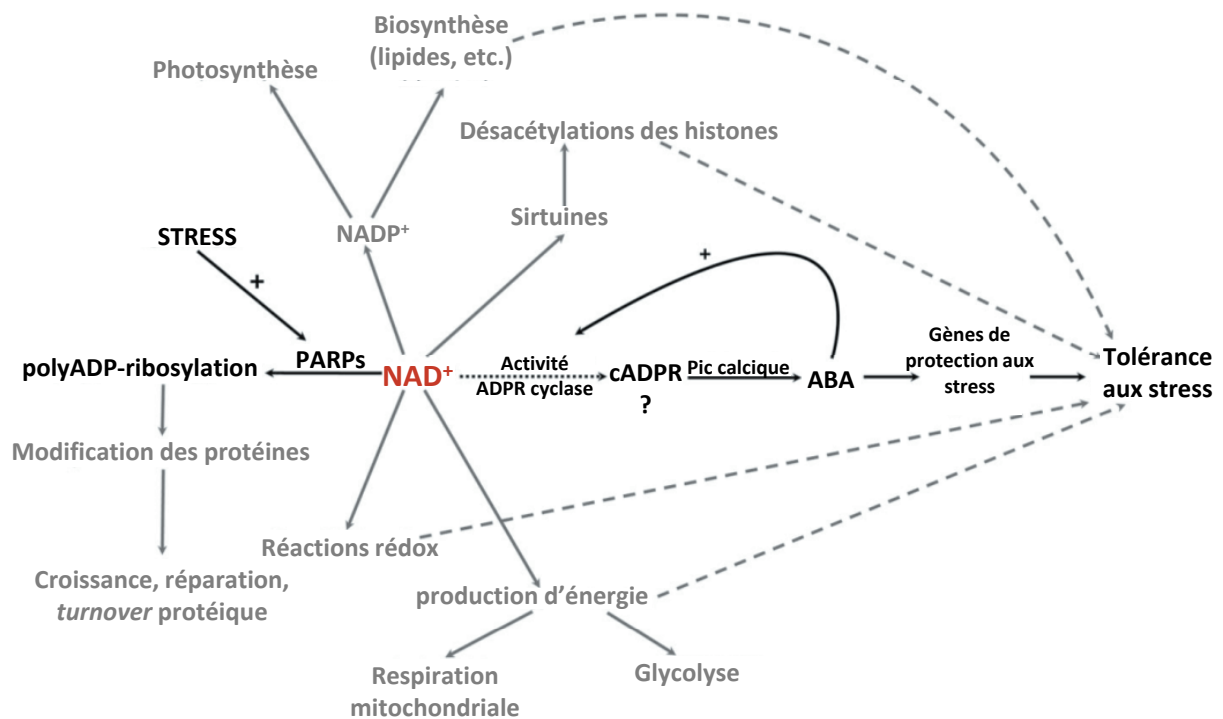


(Foyer et Noctor, 2009) ou à la blessure (Yahraus *et al.*, 1995). De nombreux exemples issus de la littérature illustrent l'implication du NAD dans la réponse aux stress oxydants. Chez le mutant de tabac *CMSII*, l'absence du complexe I mitochondrial s'accompagne d'une augmentation des niveaux de nucléotides à pyridine et d'une tolérance accrues des plantes au stress oxydant (ozone) (Dutilleul *et al.*, 2003) (**Figure 36 B**). Chez le riz, une expression constitutive du gène codant la NADK2 chloroplastique d'*Arabidopsis thaliana* conduit à une augmentation de NADP(H) et à une meilleure tolérance des transformants à des dommages oxydants (Takahara *et al.*, 2010). A l'inverse, une altération de l'activité NADK3 diminue la production cytosolique de NADPH lors de traitements avec des molécules générant divers stress abiotiques : oxydant (méthylviologène), hydrique (ABA), salin et osmotique (NaCl et mannitol) (Chai *et al.*, 2006). Egalement, une hypersensibilité à l'ABA et au NaCl a été observée chez le mutant *AtNIC1* chez lequel l'activité nicotinamidase NIC1 est altérée (Wang et Pichersky, 2007).

Les métaux lourds (cadmium, cuivre ou zinc) sont toxiques pour de nombreux organismes et peuvent générer un stress oxydant auquel les cellules font face grâce aux propriétés antioxydantes du glutathion (Gratão *et al.*, 2005). Le glutathion est le précurseur direct des phytochélatines qui permettent la séquestration des métaux lourds. Dans ce contexte, une étude a montré qu'une application de NAM et de NA permettait de diminuer la toxicité des métaux lourds chez *Salix* ; cependant aucune augmentation de glutathion n'a pu être corrélée à cette résistance (Ohlsson *et al.*, 2008).

Lors de différents stress (biotiques et abiotiques), les enzymes du catabolisme du NAD (PARPs, sirtuines) peuvent intervenir et conduire à un clivage de la molécule de NAD qui s'accompagne d'une production concomitante de nicotinamide (Amor *et al.* 1998 ; Graziani *et al.* 2005 ; De Block *et al.*, 2005 ; Vanderauwera *et al.*, 2007). Des travaux ont souligné l'intérêt de diminuer la production de PARPs pour conférer aux plantes une résistance à un large éventail de contraintes environnementales telles qu'un stress lumineux, une période de sécheresse ou de fortes chaleur (De Block *et al.*, 2005). En effet, lors d'un stress, une forte activation des PARPs provoquerait une déplétion du pool de NAD. Ceci peut s'accompagner d'une oxydation du tampon rédox cellulaire. C'est pourquoi les plantes dépourvues de

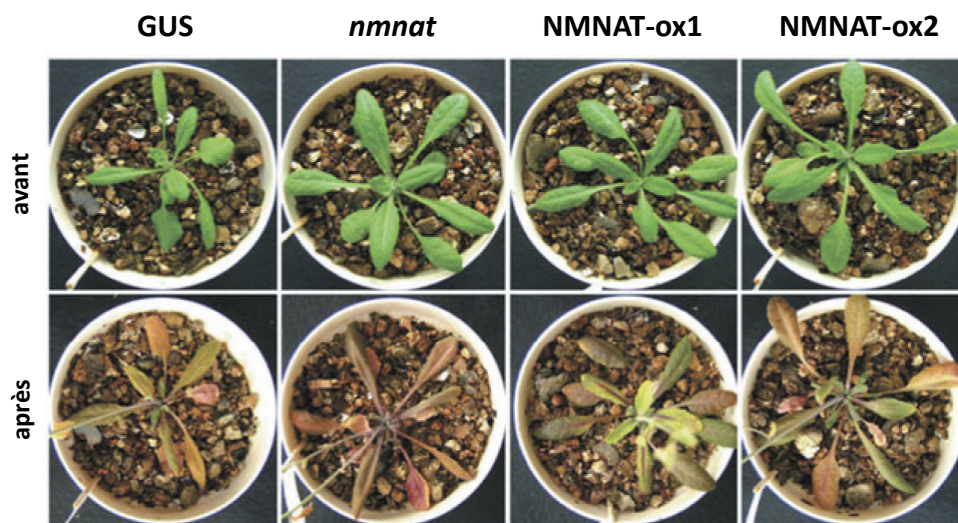




**Figure 38. Modèle d'interactions entre les polyADP-ribose polymérase (PARPs) et le NAD dans la réponse aux stress chez les plantes dépourvues de PARP2.** Les variations environnementales provoquent une augmentation du pool de NAD chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana* dépourvues de PARP2. Grâce à l'activité de l'ADP-ribosyl cyclase, le NAD pourrait être converti en ADP-ribose cyclique (cADPR). Des pulsations de pics calciques stimuleraient la biosynthèse de l'acide abscissique (ABA), induisant ainsi l'expression de gènes de réponse à l'ABA et de gènes impliqués dans la protection des cellules face aux stress. De plus, l'ABA peut réguler positivement l'activité de l'ADP-ribosyl cyclase, fournissant un mécanisme relai destiné à amplifier le signal cADPR original. D'autres voies de signalisation potentiellement impliquées dans la modulation de la tolérance aux stress sont indiquées en gris. La contribution relative de chacune de ces voies n'est pas connue, et pourrait dépendre de la nature et de l'intensité du stress. D'après [Vanderauwera et al. \(2007\)](#).

PARPs apparaissent plus résistantes au stress (De Block *et al.*, 2005). L'utilisation d'inhibiteurs de PARPs réduirait la mort cellulaire induite par les ROS au cours d'un stress oxydant (Amor *et al.*, 1998). Doucet-Chabeaud *et al.* (2001) ont montré une expression différentielle des gènes *AtPARP-1* et *AtPARP-2* selon le type de stress : ces deux gènes sont fortement exprimés en réponse aux radiations ionisantes, alors que le gène *AtPARP-2* est préférentiellement induit en conditions de stress hydrique ou par des métaux lourds. Il semblerait qu'une consommation en NAD diminuée permette de maintenir l'homéostasie énergétique et limiterait ainsi la production de ROS d'origine mitochondriale. Une autre étude menée chez des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* et de *Brassica napus* aux niveaux de PARPs diminués a montré une tolérance de ces plantes à une large palette de stress abiotiques (Vanderauwera *et al.*, 2007). Les auteurs attribuent cette tolérance non seulement à une efficacité énergétique optimisée en diminuant le catabolisme du NAD, mais également à des niveaux en ABA augmentés qui induiraient l'expression de nombreux gènes liés aux stress (**Figure 38**).

Outre l'importance du NAD et NADPH dans le métabolisme de l'ABA (voir plus haut), l'interconnexion entre la signalisation ABA-dépendante et l'homéostasie du NAD peut s'articuler autour du cADPR. Cette molécule signal est produite à partir du NAD et alimente la voie de transduction du signal ABA chez les plantes (Hunt *et al.*, 2007 ; Hunt et Gray, 2009). Chez *Arabidopsis thaliana*, une application exogène d'ABA favorise l'activité ADPR cyclase, augmentant alors les niveaux de cADPR, et par conséquent intensifiant la transduction de ce signal (Wu *et al.*, 1997 ; Sánchez *et al.*, 2004). Dans la réponse des plantes à la sécheresse, une étude récente s'est préoccupée du rôle fonctionnel du NAD dans les mouvements stomatiques et révèle que l'enzyme NaMNAT régule l'homéostasie du NAD afin de protéger les cellules de garde d'une bouffée oxydante ABA-dépendante (Hashida *et al.*, 2010) (**Figure 39**). En outre, une étude présentée en **Annexe 6**, et à laquelle j'ai participé, indique que le pool élevé de nucléotides à pyridine chez le mutant de tabac mitochondrial *CMSII* est corrélé à un maintien du contenu en eau de la plante et à une résistance au stress hydrique (Djebbar *et al.*, 2011). Les niveaux augmentés en NAD pourraient influencer la signalisation de l'ABA et réduire la conductance hydraulique, ce qui aboutit à une meilleure tolérance face à la sécheresse.



**Figure 39. La résistance à la sécheresse médiée par la NaMNAT chez *Arabidopsis thaliana*.** Des lignées contrôles (GUS), mutantes hétérozygotes pour le gène *AtNaMNAT* (*nmnat*) et surexprimeurs pour ce même gène (NMNAT-ox1 et NMNAT-ox2) ont été cultivées en conditions normales d'irrigation (avant) et après arrêt de l'irrigation pendant deux semaines (après). Alors que le stress hydrique provoque la mort des plantes GUS et *nmnat*, les surexprimeurs NMNAT-ox1 et NMNAT-ox2 apparaissent tolérants à la sécheresse. D'après Hashida *et al.* (2010).

Les sirtuines interviendraient également dans la réponse aux stress environnementaux. Ces désacétylases émergeraient comme enzymes anti-vieillessement impliquées dans la longévité chez plusieurs organismes modèles (Michan et Sinclair, 2007 ; Westphal *et al.*, 2007 ; Caito *et al.*, 2010). Jusqu'alors, une étude a montré que SIRT1 pouvait favoriser la capacité des systèmes antioxydants (catalase, superoxyde dismutase) et réduire ainsi un état cellulaire oxydant (Elliott et Jirousek, 2008). Chez le riz, la sous-expression d'une histone désacétylase *OsSRT1* entraîne une mort cellulaire associée à la fragmentation de l'ADN et une plus grande sensibilité aux stress environnementaux (Huang *et al.*, 2007).



## VII. Objectifs du travail de thèse

---

L'état de la littérature suggère fortement une implication de la biosynthèse du NAD comme régulateur métabolique de nombreux processus physiologiques des plantes, leur assurant une croissance harmonieuse et une tolérance à une batterie de stress. L'étape réactionnelle catalysée par la QPT suscitait déjà un vif intérêt dans l'équipe d'accueil. Cette étape enzymatique clé se situe au point de jonction des voies de synthèse et de recyclage et régulerait le flux de synthèse vers le NAD. Le laboratoire avait obtenu des plants d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant le gène *nadC* d'*Escherichia coli* codant la QPT bactérienne.

Dans ce contexte scientifique, le projet de thèse vise à étudier l'implication des voies de biosynthèse du NAD dans la physiologie des plantes et à résoudre la question des mécanismes régulateurs de la synthèse de ce dinucléotide. Les objectifs généraux de cette étude sont d'une part d'étudier l'influence des niveaux de NAD sur le métabolisme et la physiologie des plantes, en particuliers en conditions de stress et d'autre part de mieux cerner l'implication des étapes enzymatiques clé de la biosynthèse du NAD dans l'homéostasie de cette molécule.

C'est pourquoi nous avons décidé de tester la potentialité de la QPT à contrôler la biosynthèse du NAD par différentes approches:

- 1) l'analyse de transformants d'*Arabidopsis thaliana* surproduisant la QPT bactérienne *via* la surexpression du gène *nadC* ;
- 2) les caractérisations moléculaire, biochimique et physiologique de mutants *knock-out* et surexpresseurs QPT d'*Arabidopsis thaliana*.

En outre, j'ai contribué à l'étude d'autres plantes mutantes chez lesquelles l'augmentation des teneurs en NAD résulte d'un effet pléiotrope (mutants du complexe I mitochondrial de tabac et d'*Arabidopsis thaliana*).



# Matériels et Méthodes



Gène	Code ATG	Produit du gène	Amorce Sens (LP)	Amorce Reverse (RP)	Utilisation
<i>nadC</i>	-	Quinolinate phosphoribosyl-transférase d' <i>Escherichia coli</i>	ATGTTTCTACCTTATGATTCGT	TTAGCGAAAACGCATTGAAAG	Génotypage PCR
<i>N57</i>	<i>At2g01350</i>	Quinolinate phosphoribosyl-transférase	TACGGGTACCTGCATAGTTGG	ATGGAAACACCTCAAGGAGG	Génotypage PCR
<i>ACT2</i>	<i>At3g18780</i>	Actine 2	CTGTACGGTAACATTGTGCTCAG	CCGATCCAGACACTGTACTTCC	RT-qPCR
<i>AO</i>	<i>At5g14760</i>	Aspartate oxydase	GATCGTTCACGCTGCTGATA	TGTGTTCAAGCCATCTGAG	RT-qPCR
<i>QS</i>	<i>At5g50210</i>	Quinolinate synthase	AAGCTTTGCTCAAGCTCAGG	TCAAGACCCCTTGCACTTCT	RT-qPCR
<i>QPT # 1</i>	<i>At2g01350</i>	Quinolinate phosphoribosyl-transférase	GGAGTTGCTCTTGTGACATG	TCTCCATCTTTGCGATCC	RT-qPCR
<i>QPT # 2</i>	<i>At2g01350</i>	Quinolinate phosphoribosyl-transférase	GGAATTGCAACCTTACCAA	ATCTACCAACCGCAAACAG	RT-qPCR
<i>NaMNAT</i>	<i>At5g55810</i>	Acide nicotinique mononucléotide adényltransférase	ATGTCCTTACCAGTCGAG	GGAGGATTGAACTCCAGT	RT-qPCR
<i>NADS</i>	<i>At1g55090</i>	NAD synthétase	AGGAATTCAGTCCCAT	GCCGTGTCGATAAACTGGAT	RT-qPCR
<i>NIC1</i>	<i>At2g22570</i>	Nicotinamidase 1	CGTATCGATATGGCGAATCA	TGCAGAAGCCATTAACAACG	RT-qPCR
<i>NIC2</i>	<i>At5g23230</i>	Nicotinamidase 2	GAAATCATCCCGAAATCAA	TCCGATCTTGTCAGCTTCT	RT-qPCR
<i>NIC3</i>	<i>At5g23220</i>	Nicotinamidase 3	CGAAAGCGAGATCCAACTC	TGGTGAGAAGCTTGTGAGG	RT-qPCR
<i>NaPT1</i>	<i>At4g36940</i>	Nicotinate phosphoribosyl-transférase	ATGCATTGGAATTGGAACC	AAAGTTTGTCCGAGGCTGA	RT-qPCR
<i>NaPT2</i>	<i>At2g23420</i>	Nicotinate phosphoribosyl-transférase	GTGGAAGTGACAGTGAAGCA	TGATCAGGTGCGATGTTTTTC	RT-qPCR
<i>PARP1</i>	<i>At4g02390</i>	PAR polymérase 1	AAAACAGACCAAACCCATC	ACAACAACATCCCTTGGAG	RT-qPCR
<i>PARP2</i>	<i>At2g31320</i>	PAR polymérase 2	AAGAAAAATCCGGTGGTCT	TTGGTGCAGTGTTCCTCT	RT-qPCR
<i>SRT1</i>	<i>At5g55760</i>	Sirtuine 1	GGAGAAGCACTGCAAAAAGG	CTTGCCTCACCTTTGAGAC	RT-qPCR
<i>SRT2</i>	<i>At5g09230</i>	Sirtuine 2	AGCACCTCAAGGTTTCTGA	GGTGAGTCTCGAGCTTGTCT	RT-qPCR
<i>GLIP1</i>	<i>At5g40990</i>	Lipase GLIP1	ATTCAAATACGCCCTTCACG	GGCCTCCACCGTATTGATT	RT-qPCR et vérification CATMA
<i>PR1</i>	<i>At2g14610</i>	Protéine PR1	AATCGCTTTGTAGCTCTGTAGGT	ACCCTTAGATAATCTGTGGGCTAT	RT-qPCR et vérification CATMA
<i>ICS1</i>	<i>At1g74710</i>	Isochorismate synthase 1	GCTCTATCATTCCATCTCTCGTAG	CATTATAGACATCGAACATGACTC	RT-qPCR
?	<i>At4g28088</i>	<i>Cold/Salt responsive protein</i>	CCCTCTCTAGGGGTTTGTCT	TCACGATCCAGTACACGAT	Vérification CATMA
?	<i>At5g46950</i>	<i>Invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein</i>	AAGACCCGCAATCGTCATAC	GAGTAGTTGCGGCTTGTCT	Vérification CATMA
<i>NRT1.1</i>	<i>At1g12110</i>	Transporteur de nitrates NRT1.1	ACAATCATACCGGACTTCG	CCCAGACACTAGCCTTAC	RT-qPCR
<i>NRT2.1</i>	<i>At1g08090</i>	Transporteur de nitrates NRT2.1	TCTTGGTGCTCAATCTAGGTCA	GTTTGAACGGCATAACCACAGA	RT-qPCR
<i>NRT2.7</i>	<i>At5g14570</i>	Transporteur de nitrates NRT2.7	CCTTATCTCGTCCGTTTC	AATTCGGCTATGGTGGAGTA	RT-qPCR
<i>AMT1.1</i>	<i>At1g64780</i>	Transporteur d'ammonium AMT1.1	TGCTTTGTGCTGGATCAGTC	AGGTGTACCAAGGCGAATG	RT-qPCR
<i>NIA1</i>	<i>At1g77760</i>	Nitrate réductase 1 (isoforme mineure)	CTCTCGTTGATGCTGAGCTG	TCACCTCAACCTCGTTACC	RT-qPCR
<i>NIA2</i>	<i>At1g37130</i>	Nitrate réductase 2 (isoforme majeure)	TCACAGGAAACATCCCTTC	CGGTAAGCAAACCTCGGAGAC	RT-qPCR
<i>NiR1</i>	<i>At2g15620</i>	Nitrite réductase	CGGTTTGGATTCAATTGCT	TGGAAGAAGCTCATCAGCAG	RT-qPCR
<i>GLN1</i>	<i>At1g48470</i>	Glutamine synthétase 1	TTGGTCTGACATTGCTGAT	TGGCACCACCAATACTCAA	RT-qPCR
<i>GLN2</i>	<i>At5g35630</i>	Glutamine synthétase 2	CCGTGGAGGCAATAACATCT	TCGCCAGAGACCTTCTGTT	RT-qPCR
<i>GLU1</i>	<i>At5g04140</i>	Glutamate synthase (Fd-GOGAT) 1	GCCTGAGGAAGCAACGATAG	GCCTGAGGAAGCAACGATAG	RT-qPCR
<i>GLU2</i>	<i>At2g41220</i>	Glutamate synthase (Fd-GOGAT) 2	GTCCGCGAAAAGAGTGAGAC	ACTCAAGAAGATCGCGAAA	RT-qPCR
<i>GLT1</i>	<i>At5g53460</i>	Glutamate synthase (NADH-GOGAT)	CTTGACGAGATGACTTCA	TTCCAGGTTGGTAAGTGC	RT-qPCR

Figure (Tableau) 40. Amorces oligonucléotidiques utilisées dans ce travail. Les points d'interrogations désignent des gènes dont la fonction biologique n'est pas clairement identifiée.

## I. Matériels biologiques

---

### A. Matériel végétal

---

#### 1. Plantes d'*Arabidopsis thaliana*

---

Les expériences ont été réalisées sur la Brassicacée modèle *Arabidopsis thaliana* écotype Columbia (Col0) et différentes lignées transgéniques obtenues dans le fond génétique Col0.

Deux lignées contrôles ont été utilisées. D'une part la lignée sauvage Col0 et d'autre part la lignée transgénique notée *Ctrl* obtenue par transformation de plantes sauvages *via* le vecteur vide pCW162 (voir Résultats **Figure 48 A**). Cette lignée *Ctrl* permet de s'affranchir des potentielles variations dues à l'insertion de l'ADN-T (ADN de transfert) contenant la cassette de résistance à l'antibiotique kanamycine. Les variations ainsi observées reflèteront seulement la sous/surexpression des gènes d'intérêt.

A mon arrivée, le laboratoire (Bertrand Gakière et Jutta Hager) avait obtenu plusieurs lignées surexprimant le gène *nadC* d'*Escherichia coli*, sous contrôle du promoteur fort et constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) présent dans le vecteur pCW162 (voir Résultats **Figure 48 A**). L'ADNc du gène *nadC* d'*Escherichia coli* est sous-cloné entre les sites de restrictions Pst1 et BamH1 du vecteur binaire pCW162, fournie par Marie-Pascale Doutriaux, sous contrôle du promoteur 35S. Le vecteur pCW162 dérive du vecteur binaire pPZP111 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994). Les plantes transformées avec le vecteur pCW162 sont résistantes à la kanamycine. Les deux lignées *nadC* 4.11 et 15.3 sélectionnées sur leur niveau élevé d'expression *nadC*. La présence du transgène est vérifiée par amplification PCR du gène *nadC* en utilisant les amorces notées *nadC* (sens et reverse) dans la **Figure 40**.



La lignée mutante d'insertion ADN-T pour le gène de la quinolinate phosphoribosyltransférase (numéro d'accèsion *At2g01350*) a été obtenue à partir de la collection du Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, San Diego, USA (Alonso *et al.*, 2003) (écotype Columbia, Col0): SALK\_075260, lignée *N575260*. Les plantes homozygotes pour l'insertion de l'ADN-T sont notées *N57* dans cette étude. Elles ont été isolées par génotypage PCR en utilisant les couples d'amorces LP-N57/RP-N57 (allèle sauvage) et LP-N57/LBb1.3 (ATTTGCCGATTCGGAAC) (allèle muté, séquence du T-DNA) (**Figure 40**). Le T-DNA est positionné dans le deuxième exon du gène *At2g01350* pour la lignée *N575260*. Ne disposant pas de seconde lignée insertion ADN-T dans le gène *At2g01350*, nous avons entrepris de compléter la lignée *N57* homozygote par le gène endogène de la QPT. Pour ce faire, le gène complet contenant 1 kb de promoteur a été cloné par Alexis Kasaras (Freie Universität, Berlin, Allemagne) entre les sites Xba1 et Spe1 du vecteur pCB302 qui contient le gène *BAR* (<http://www.springerlink.com/content/t94w6463mv108155/>) codant une phosphinothricine acétyl transférase (PAT) et conférant la résistance au Basta® (Bayer CropScience, Lyon, France). Ces lignées sont en cours de sélection et de caractérisation.

Des lignées surexpresses QPT ont été obtenues par transformation de plantes Col0 après sous-clonage de l'ADNc du gène codant la QPT dans le vecteur pCW162 sous contrôle du promoteur 35S CaMV au laboratoire (travail réalisé conjointement avec Bertrand Gakière), après ajout des sites de clonage Xba1 en 5' et Sal1 en 3'. La construction utilisée comporte la séquence de l'ADNc complet incluant la zone codant un peptide d'adressage plastidial, permettant la surproduction de la QPT dans son territoire d'adressage naturel.

### B. Conditions de culture des plantes

---

#### 1. Cultures en pots

---

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont semées sur terreau traité préventivement par imprégnation de Prévicur® (Bayer CropScience, Lyon, France) à 1 mL.L<sup>-1</sup> et de Trigard® (Syngenta, Guyancourt, France) à 0.2 g.L<sup>-1</sup> pour prévenir l'apparition de fonte des semis et le

Macro-éléments		Micro-éléments	
Composé	Concentration	Composé	Concentration
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1.11 mM	$\text{CuSO}_4$	1.70 $\mu\text{M}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.28 mM	$\text{ZnSO}_4$	2.20 $\mu\text{M}$
$\text{MgSO}_4$	0.56 mM	$\text{MnSO}_4$	11.0 $\mu\text{M}$
$\text{KNO}_3$	2.78 mM	$\text{H}_3\text{BO}_3$	56.0 $\mu\text{M}$
		$\text{MoO}_3$	0.10 $\mu\text{M}$
		KCl	56.0 $\mu\text{M}$
		Fe-EDTA	67.0 $\mu\text{M}$



**Figure 41. Cultures hydroponiques de plantes d'*Arabidopsis thaliana*.** A : composition du milieu de culture liquide. B et C : clichés photographiques du système de culture hydroponique utilisé (B : vue de dessus ; C : vue de profil avec feuilles et racines ; plantes âgées de 4 semaines de jours courts).

développement de sciarides. Afin d'assurer une germination synchrone des graines, le semis est suivi d'une période de stratification à forte humidité et basse température (4 °C) pendant deux jours. La germination des plantules est obtenue en chambre de culture dite *Jours Courts* sous une photopériode de 8 h de lumière à 22 °C et 16 h d'obscurité à 19 °C, sous intensité lumineuse de 200  $\mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Les premiers jours du passage des semis en chambre de culture se font sous miniserre pour éviter une dessiccation importante du sol. La miniserre est ensuite retirée et l'humidité est régulée à 65 %. L'ajout de solution nutritive est réalisé deux fois par semaine. Les plantules âgées de deux semaines sont repiquées en pots individuels. L'échantillonnage est effectué en milieu de photopériode et les échantillons prélevés sont rapidement congelés dans l'azote liquide puis conservés jusqu'aux analyses à - 80 °C.

### 2. Cultures hydroponiques d'*Arabidopsis thaliana*

---

Les cultures hydroponiques s'effectuent en boîte de cônes de 1 mL stériles (Greiner Bio One, Courtaboeuf, France) surmontée d'un filet de nylon stérile de 7 cm sur 10 cm de 250  $\mu\text{m}$  de pore (Sefar, Heiden, Suisse). Les boîtes sont remplies d'une solution nutritive de Hoagland's (Hoagland et Arnon, 1950) modifiée dont la composition est indiquée dans la **Figure 41**.

Les graines d'*Arabidopsis* préalablement désinfectées sont semées sur le filet de nylon avec un cure-dents au niveau des trous de la boîte prévus pour les cônes. Le filet de nylon est en contact direct avec la solution nutritive. Les boîtes sont disposées en chambre de culture thermorégulée à 23 °C avec une photopériode de 8 h (dite *Jours Courts*) et sous une intensité lumineuse de 200  $\mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Une semaine après semis, les couvercles de boîtes sont entre-ouverts pour permettre une circulation de l'air, puis enlevés 3 jours plus tard et les plantes sont cultivées jusqu'à ce qu'elles soient suffisamment grandes pour être récoltées (stade rosette 8 feuilles). Les milieux sont renouvelés chaque semaine.



Les expériences de marquage à l'azote  $^{15}\text{N}$  sont menées en utilisant une solution nutritive dont le  $\text{KNO}_3$  est remplacé par du  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  marqué au  $^{15}\text{N}$  à 98 % (Eurisotop, Saint-Aubin, France) pendant 5 jours.

### 3. Cultures *in vitro*

---

Les cultures *in vitro* s'effectuent dans une chambre de culture thermorégulée à 23 °C sous une photopériode (dite *Jours Longs*) de 16 h et une intensité lumineuse de 200  $\mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Avant semis, les graines sont stérilisées durant 5 minutes dans un mélange éthanol (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) : barychlore (Bayrol, Dardilly, France) (95/5), puis rincées à l'éthanol absolu et séchées sous hotte stérile à flux laminaire. Les graines désinfectées et sèches sont semées à la volée sur un milieu de culture solide Kalysagar (Kalys SA, Bernin, France) avec demi-MS (Murashige & Skoog) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) additionné de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de kanamycine monosulfate (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). La germination des semis est synchronisée par un passage de deux jours à l'obscurité à 4 °C, puis le semi est transféré en chambre de culture.

Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* sont cultivées en boîtes gélosées verticales afin d'en mesurer la croissance racinaire. Les graines préalablement désinfectées sont semées sur une rangée, puis la germination est synchronisée par passage au froid et à l'obscurité pendant 48 h. Les boîtes sont ensuite disposées à la verticale en chambre de culture *in vitro*. Dès la germination, la taille des racines est mesurée au cours du temps.





## C. Souches bactériennes

---

### 1. Agents pathogènes

---

Deux souches de la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) ont été utilisées : la souche *Pst* DC3000, virulente sur Col-0 et la souche avirulente *Pst-AvrRpm1* qui dérive de *Pst* DC3000 et qui porte le gène bactérien d'avirulence *AvrRpm1*. Cette souche avirulente a été obtenue auprès de Jane Glazebrook (University of Minnesota, St Paul, USA). Les deux souches de *Pst* utilisées possèdent les gènes de sélection pour la résistance à deux antibiotiques : la rifampicine et la kanamycine. Les bactéries sont conservées à - 80 °C dans du milieu de culture supplémenté à 40 % de glycérol.

La culture des bactéries est réalisée en conditions stériles par étalement sur milieu solide LB agar sélectif contenant 50 µg.mL<sup>-1</sup> de rifampicine et 25 µg.mL<sup>-1</sup> de kanamycine. Cette culture est réalisée deux jours sous étuve à 30 °C. Une colonie isolée est ensuite repiquée dans un erlenmeyer contenant 500 mL de milieu LB liquide supplémenté à 50 µg.mL<sup>-1</sup> de rifampicine et 25 µg.mL<sup>-1</sup> de kanamycine et incubée sur la nuit à 30 °C sous agitation.

Le jour de l'inoculation, les bactéries sont sédimentées une première fois par centrifugation (10 minutes à 3000 g) dans un tube stérile de 50 mL. Le culot bactérien obtenu est nettoyé dans environ 10 mL de Tampon mock (MgCl<sub>2</sub> 10 mM). Les bactéries sont sédimentées une deuxième fois par centrifugation. Le deuxième culot est alors resuspendu dans 5 mL de mock et la concentration en bactéries dans la suspension est évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm, puis ajustée de façon à obtenir une suspension bactérienne à 10<sup>5</sup> unités formant des colonies (cfu) par mL de suspension (DO<sub>600</sub>=0.0001).



### 2. Autres souches bactériennes

---

La souche bactérienne d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) (Koncz et Schell, 1986) contenant le vecteur binaire pBINm-gfp5-ER (Haseloff *et al.*, 1997) a été utilisée pour la transformation stable d'*Arabidopsis thaliana* par technique de *floral dip* (Clough et Bent, 1998). Cette souche est désarmée (en d'autres termes elle ne possède plus ses facteurs de virulence), mais possède une forte capacité d'infection. En effet, durant la phase d'infection, le fragment d'ADN de transfert (ADN-T) porté sur le plasmide d'infection s'intègre de façon aléatoire dans le génome de la plante. La souche GV31V1 possède les gènes de résistance à la gentamycine et la rifampicine.

La souche bactérienne d'*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) a également été utilisée. Elle constitue un des hôtes nécessaires aux étapes de clonage des inserts d'ADNc (ou d'ADN génomique dans le cas de la complémentation du mutant N575260) depuis le plasmide binaire pCW162.

#### D. Un système inductible d'augmentation des niveaux de NAD

---

##### 1. Incubation de disques foliaires en présence de quinolinate

---

Des disques foliaires de 7 mm de diamètre ont été prélevés sur les feuilles des plantes transgéniques *Ctrl*, *nadC 15.3* et *4.11* cultivées 5 semaines en jours courts puis une semaine en jours longs (photopériode 16 h de lumière). Les disques sont placés dans des boîtes de Pétri contenant 20 mL de tampon MOPS à 50 mM pH 6, en présence ou non de 100  $\mu$ M de quinolinate (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). La solution stock de quinolinate est préparée à 10 mM et dissoute dans l'eau bidistillée à 60 °C, puis refroidie sur paille. L'incubation est réalisée à l'obscurité pendant 48 h pour augmenter les teneurs en NAD de 3 à 4 fois chez les lignées *nadC*. Les disques sont ensuite prélevés puis rincés à l'eau bidistillée. La masse fraîche est notée. L'échantillonnage est réalisé en poolant 10 disques de



plantes différentes de façon à obtenir environ 100 mg. Les échantillons sont directement congelés dans l'azote liquide, puis conservés à - 80 °C jusqu'à leur analyse.

### 2. Infiltration *in folia* du quinolinate

---

La surproduction inductible de NAD chez les lignées *nadC* peut être réalisée par infiltration des feuilles à l'aide d'une seringue dépourvue d'aiguille (Terumo, Guyancourt, France) avec une solution stérile de quinolinate 5 mM pH 6.

## IV. Obtention des lignées transgéniques

---

### A. Transformation d'*Arabidopsis thaliana* par *Agrobactéries*

---

La transformation des plantes d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisée selon la technique du *floral dip* (Clough et Bent, 1998).

### B. Sélection des plantes transformées

---

#### 1. Sélection sur kanamycine

---

Les graines issues des transformants *nadC* et *35S::QPT* sont récoltées puis conservées à l'obscurité à 4 °C. Elles sont stérilisées selon le protocole décrit plus haut, puis semées à la volée sur milieu sélectif (Khalysagar, demi-MS) contenant 50 µg.mL<sup>-1</sup> de kanamycine monosulfate. Après environ 10 jours en chambre de culture *in vitro* (23 °C, sous intensité lumineuse de 200 µmoles de photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), les plants résistants sont transférés sur pot de



terreau en chambre de culture *Jours Longs* afin d'obtenir des graines qui subiront un nouveau régime de sélection. Le nombre des plantes transgéniques putatives est noté pour sélectionner les lignées qui ont inséré qu'une seule copie du transgène (rapport  $\frac{3}{4}$  non-résistants,  $\frac{1}{4}$  résistants). Les descendants sont sélectionnés jusqu'à obtention de lignées stables homozygotes pour l'insertion ADN-T. Cinq lignées indépendantes ont été sélectionnées (Q1 à Q5).

### 2. Sélection sur Basta®

---

Les transformants issus de la complémentation du mutant *N575260* sont sélectionnés sur terreau par pulvérisation de solution Basta® (Bayer CroScience, Lyon, France) à une concentration de 1.25 mL.L<sup>-1</sup>. Le Basta® contient l'herbicide glufosinate. L'opération est répétée deux fois avec 3 à 4 jours d'intervalle. Les plantes résistantes sont ensuite transférées en pot jusqu'à obtention de graines.

## VIII. Techniques d'études moléculaires

---

### A. Amorces oligonucléotidiques utilisées dans ce travail

---

Les différentes amorces PCR de génotypage, de clonage et RT-qPCR sont listées dans la **Figure 40**. Pour le génotypage du mutant *N57*, une amorce s'hybridant sur l'ADN-T a été utilisée : LBb1.3 (ATTTTGCCGATTCGGAAC).





## B. Criblage par PCR des insertions d'ADN-T dans les mutants d'*Arabidopsis thaliana*

---

### 1. Extraction d'ADN génomique à partir d'échantillon foliaire

---

Une feuille de chaque plantule âgée de deux semaines est broyée au broyeur à billes (2 x 30 secondes, 30 Hz) (Retsch MM300, Verder, Eragny sur Oise, France). Sont ensuite ajoutés 400 µL de tampon d'extraction d'Edwards (Tris pH 7.5 1 M, NaCl 4 M, EDTA 0.5 M, SDS 20 %). Ce broyat est clarifié par 10 minutes de centrifugation à 11000 *g* à 4 °C. Pour précipiter l'ADN, 200 µL de surnageant sont prélevés et mélangés à 200 µL d'isopropanol (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Après une seconde centrifugation à 11000 *g* de 10 minutes à température ambiante, le surnageant est jeté et le culot contenant l'ADN est nettoyé avec 1 ml d'éthanol (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) à 70 %. Une brève centrifugation permet de retirer le reste d'éthanol, puis les tubes sont mis à sécher 5 minutes à température ambiante. Les ADN ainsi extraits sont resuspendus dans 100 µL de TE (Tris 10 mM pH 7.9, EDTA 1 mM) puis conservés à 4 °C. D'après [Weigel et Glazebrook \(2002\)](#).

### 2. Amplification par PCR

---

La PCR est réalisée sur chaque échantillon d'ADN de plante afin de tester la présence ou non de l'ADN-T dans le gène d'intérêt. L'ADN de chaque échantillon est ainsi amplifié en utilisant deux différents couples d'amorces (**Figure 40**). Une PCR vise à amplifier un fragment du gène sauvage et une autre PCR à amplifier un fragment du gène sauvage disrupté par l'ADN-T. Chaque mélange réactionnel contient 0.25 µL (5 unités.µL<sup>-1</sup>) de GoTaq polymérase (Promega, Charbonnière les Bains, France), 5 µL de tampon pour Go Taq (Tris-HCl 250 mM, pH 9, NaCl 250 mM), 1 µL de dNTP (5 mM), 5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM et 10.75 µL d'eau. Pour amplifier le gène sauvage, les deux amorces à 10 mM du gène sauvage à amplifier sont ajoutées en quantité équivalente (1 µL). Pour amplifier le gène muté contenant l'ADN-T, sont ajoutés un type d'amorce complémentaire à une partie de l'ADN-T et un autre type



d'amorce complémentaire à l'une des bornes du gène sauvage de sorte que ces deux amorces soient antiparallèles. Les 25 µl de mélange réactionnel sont soumis à 30 cycles de réaction PCR durant 90 minutes et suivant le programme : 30 secondes à 94 °C, 30 secondes à 57 °C et 1 minute à 72 °C.

### 3. Electrophorèse en gel d'agarose

---

La séparation des fragments d'ADN linéaires est obtenue par migration électrophorétique dans un gel horizontal contenant 1 % (P/V) d'agarose. Le tampon TAE de migration est composé de Tris-acétate 40 mM et EDTA 1 mM (pH 8.3). La migration s'effectue sous une tension comprise entre 80 et 150 V. Après migration, les fragments d'ADN ayant fixé le bromure d'éthidium (BET, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) sont visualisés sous lumière ultraviolette (UV).

### 4. Transformation d'Agrobactéries par électroporation

---

Cette technique permet d'introduire un ADN plasmidique dans une cellule hôte bactérienne par un choc électrique (Dower *et al.*, 1988). Elle a été utilisée pour la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Pour la préparation des bactéries électrocompétentes, 500 mL de milieu LB sontensemencés avec une pré-culture de la nuit et la croissance a lieu jusqu'à une DO<sub>600</sub> de 0.8. La culture est laissée 10 minutes sur la glace, puis centrifugée à 0 °C, 15 minutes à 3000 g. Le culot obtenu est lavé deux fois avec 500 mL d'eau stérile (afin d'éliminer les sels qui pourraient diminuer la résistance électrique du milieu), puis repris dans 8 mL de glycérol stérile 10 % à 0 °C. Des aliquotes de 100 µL sont congelées dans de l'azote liquide. Environ 50 ng du plasmide transformant issu d'une préparation plasmidique sont placés sur une aliquote de bactéries électrocompétentes dans lesquelles le plasmide pénètre grâce à un choc électrique très bref, mais de forte intensité (appareil Bio-Rad Gene Pulser, 15 kV.cm<sup>-1</sup>, 25 µF, 200 Ω, Hercules, USA). Après l'impulsion



électrique, 1 mL de milieu LB est rajouté aux bactéries transformées et l'ensemble est incubé 1 h à 30 °C. Les transformants apparaissent après 16 h sur le milieu sélectif approprié.

### 5. Séquençage des fragments d'ADN

---

Les fragments d'ADN ont été séquencés sur les deux brins par la société MWG-Biotech (Ebersberg, Allemagne). Les amplicons PCR et la construction obtenue à partir du vecteur pCW162 et de l'ADNc de la QPT, conjointement avec Bertrand Gakière, ainsi que la construction de complémentation du mutant *N57* obtenue d'Alexis Kasaras, ont été séquencés afin de vérifier l'intégrité des séquences.

## IX. Techniques d'études transcriptomiques

---

### A. Approche ciblée par mesure des niveaux de transcrits de gènes d'intérêt

---

#### 1. Extraction et dosage d'ARN

---

Les ARN totaux sont extraits avec le kit Nucleospin RNAII selon le protocole du fabricant (Macherey-Nagel, Hoerd, France) à partir de 80 mg de feuilles broyées en poudre très fine au broyeur à billes (2 x 30 secondes, 30 Hz) (type Retsch MM300). La poudre obtenue est mélangée avec le tampon d'extraction et incubée 5 minutes à température ambiante. Le mélange est filtré, puis passé sur une colonne de silice qui retient les acides nucléiques. La colonne est ensuite dessalée, puis incubée avec de la DNase pour conserver uniquement les ARNs. Après lavage pour chasser la DNase, les ARNs sont élués deux fois par 40 µL d'eau. Les ARNs sont dosés par spectrophotométrie à 260 et 280 nm par un Nanodrop (type ND1000, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). L'absorbance à 260 nm permet de connaître la concentration en acides nucléiques. Le rapport A260/A280 permet



d'avoir une idée de la pureté des préparations. Une contamination par des protéines absorbant à 280 nm entraîne une diminution de ce rapport.

## 2. Synthèse des ADN complémentaires par transcription inverse

---

Les ADNc sont synthétisés à partir de 1 µg d'ARN, avec le kit *SuperScript III firststrand synthesis system for RT-PCR* d'Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), selon le protocole du fabricant. Les oligo-dT sont hybridés sur les ARNm, qui sont ensuite reverse-transcrits. En fin de réaction, un traitement à la RNAase est nécessaire pour dégrader les ARN et ne garder que les ADNc néo-synthétisés. Après synthèse, les ADNc sont dosés par spectrophotométrie (Nanodrop), puis dilués de façon à obtenir des solutions à 2 ng.µL<sup>-1</sup> et conservés à -20 °C

## 3. PCR quantitative (qPCR)

---

### a) Conception des amorces RT-qPCR

---

Les séquences des gènes ont été obtenues sur le site du TAIR (The *Arabidopsis thaliana* Information Ressource, [http://www.Arabidopsis\\_thaliana.org/](http://www.Arabidopsis_thaliana.org/)). Des critères spécifiques sont nécessaires à la conception des amorces RT-qPCR, listées dans la **figure 40**. Les produits d'amplifications comportent de 50 à 150 pb ; les amorces ne doivent ni s'hybrider entre elles ni former de structures secondaires ; la proportion en GC doit être comprise entre 40 et 60 % ; le nombre de G ou C successifs ne doit pas dépasser pas 4 ; les 5 nucléotides en 3' doivent être 3 G/C au maximum ; la T<sub>m</sub>, calculée à l'aide du logiciel en ligne Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>), doit être comprise entre 58 °C et 60 °C. La spécificité des séquences est vérifiée par un blast sur le génome sur le site du TAIR. Les amorces ont été synthétisées par les sociétés MWG-Biotech (Ebersberg, Allemagne) et Eurogentec (Angers, France). Les solutions stock sont préparées à 100 µM dans du tampon





TE et stockées à - 20 °C. Les solutions utilisées pour la réaction de qPCR sont préparées à 10 µM.

### b) PCR quantitative

---

Les RT-PCR quantitatives sont réalisées sur des plaques 96 puits dans le thermocycleur LightCycler® 480 avec le kit *LightCycler 480 SYBR Green I Master* de Roche Applied Science (Meylan, France). Les réactions s'effectuent avec 10 ng de matrice et 250 nM de chaque amorce qPCR (**Figure 40**), dans un volume final de 10 µL. Les étapes sont une dénaturation à 95 °C pendant 5 minutes, puis 40 cycles : 95 °C pendant 5 s, 56 °C pendant 15 secondes et 72 °C pendant 20 secondes. L'élongation est terminée par une étape de 15 s à 95 °C. A la fin de l'amplification, une dénaturation est effectuée par un chauffage de 60 à 95 °C, qui permet de vérifier la spécificité de l'amplification. La quantification relative, calculée par dérivées secondes, en utilisant comme référence le gène *ACT2* codant l'ACTINE2 (*At3g18780*), est réalisée par le logiciel LightCycler® 480 Software (Roche Applied Science, Meylan, France).

## B. Approche transcriptomique à large échelle par puce à ADN CATMA

---

### 1. Principe de la puce CATMA

---

L'analyse transcriptomique a été réalisée en utilisant les puces à ADN CATMA version 5 (URGV, Evry, France) contenant 34648 sondes spécifiques correspondant à 17622 gènes annotés chez *Arabidopsis thaliana* (Sclep *et al.*, 2007). A cela s'ajoutent 1259 sondes correspondant à 521 gènes microRNA ou siRNA (information disponible sur <http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++>). Cette ressource transcriptomique a été adoptée par 40 publications sur les cinq dernières années (Achard *et al.*, 2008 ; Besson-Bard *et al.*, 2009 ; Krinke *et al.*, 2009). De plus amples informations sont disponibles sur le site consacré à CATMA : <http://www.catma.org/>.



## 2. Méthode microarray CATMA

---

Un protocole régulier basé sur la répétition technique de deux réplicats biologiques indépendants a été suivi dans ce travail de thèse. Environ 100 mg de MF ont été collectés de disques de plantes différentes. Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) dont le protocole est présenté plus haut. Pour chaque comparaison et pour chaque réplicat biologique, une réplication technique avec le fluorochrome opposé est effectuée. On obtient ainsi un total de quatre hybridations par comparaison. Le marquage des ARN complémentaires avec le Cy3-dUTP ou le Cy5-dUTP (PerkinElmer, Courtaboeuf, France), l'hybridation des lames et l'acquisition du signal ont été réalisées comme décrit par [Lurin \*et al.\* \(2004\)](#).

## 3. Analyse statistique des données microarray

---

Les expériences ont été conçues avec l'aide du groupe statistique de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV, Evry, France). Les méthodes sont disponibles dans le pack R *Anapuce* (<http://cran.r-project.org/web/packages/anapuce/index.html>). La normalisation et l'analyse statistique sont basées sur l'utilisation de deux fluorochromes différents (c'est-à-dire quatre puces) par comparaison ([Gagnot \*et al.\*, 2008](#)). Pour déterminer les gènes différentiellement exprimés, un test *t* de Student est effectué sur les ratios exprimés en logarithme en base 2, en supposant une même variance des ratios logarithmiques pour tous les gènes. Les tâches affichant des variances extrêmes (trop petite ou trop grande) sont exclues. Les valeurs P brutes sont ajustées selon la méthode de Bonferroni. Il s'agit d'une "correction" de probabilité de risque d'erreur qui tient compte du nombre de tests *t* effectués. En effet, lorsqu'on fait plusieurs comparaisons impliquant les mêmes moyennes, la probabilité qu'une comparaison indique un test *t* statistiquement significatif croît avec le nombre de comparaisons. Cette correction fixée à 5 % permet un fort contrôle des faux positifs dans un contexte multi-comparatif ([Ge \*et al.\*, 2003](#)). Lorsque la valeur P de Bonferroni est en dessous du seuil de 0.05, le gène correspondant est considéré



comme différentiellement exprimé, comme décrit par [Gagnot et al. \(2008\)](#). Seul les gènes présentant des modulations de leur expression dans une même direction pour les deux réplicats biologiques sont considérés comme statistiquement significatifs. Une classification hiérarchique a été effectuée *via* le logiciel MultiExperimentViewer (MeV). Le logiciel MapMan® ([Thimm et al., 2004](#)) a permis l'analyse des catégories fonctionnelles, des diagrammes de Venn et métaboliques. Ces logiciels sont brièvement décrits plus loin (*Analyses in silico*).

#### 4. Dépôt des données microarray

---

Les données issues de l'analyse à grande échelle CATMA sont déposées sur le site Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), numéro d'accèsion GSE 19084 et sur le site CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; Project: RS09-02\_Quinolinate) en accord avec la politique dite *MIME* pour *Minimum Information About a Microarray Experiment*.

## X. Techniques d'études des protéines

---

### A. Dosage des protéines totales

---

Le dosage des protéines totales solubles permet de calculer les activités spécifiques exprimées en quantité de produit formé par unité de temps (minute) et par quantité de matière initiale (mg de protéines totales).



### 1. Dosage à 280 nm

---

L'absorption maximale des acides aminés aromatiques se situe au voisinage de 280 nm. La détection par spectrophotométrie (Nanodrop) à cette longueur d'onde évalue la quantité de protéines totales d'un extrait. Une unité d'absorption à 280 nm correspond à une concentration approximative en protéines de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

### 2. Dosage selon la méthode dite de Bradford

---

Cette quantification des protéines totales est basée sur la modification de la longueur d'onde maximale d'absorption du bleu de Coomassie G 250 une fois fixé sur les protéines (de 460 à 595 nm; [Bradford, 1976](#)). La quantification des protéines est réalisée par référence à une gamme étalon de sérum albumine bovine.

## B. Mesure des activités phosphoribosyltransférases (PRTases)

---

### 1. Extraction

---

Les enzymes sont extraites en broyant 500 mg de feuilles dans de l'azote liquide, puis 1 mL de tampon d'extraction [Tris-HCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  20 mM, DTT 5 mM, inhibiteur de protéases  $1 \text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)], pH 7.5 est ajouté. Après clarification de l'extrait par centrifugation de 10 minutes à 14000 *g* à 4 °C, 500  $\mu\text{L}$  de surnageant sont dessalés sur une colonne NAP-5 (type Sephadex G25, GE Healthcare, Vélizy, France) et élués avec 1 mL de tampon d'extraction. L'extrait obtenu noté ED (extrait dessalé) sert au dosage des protéines totales et aux mesures d'activités phosphoribosyltransférases (PRTases: QPT et NaPT).



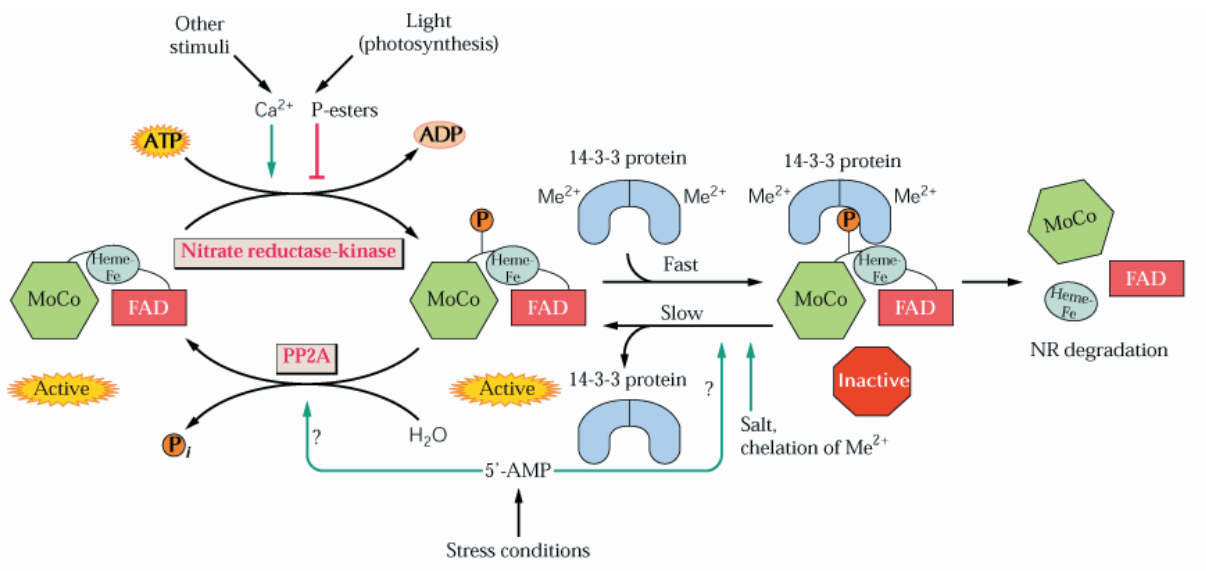


### 2. Mesure d'activité PRTase (QPT et NaPT)

---

La mesure des activités QPT et NaPT repose sur la quantification du produit de ces deux réactions : le NaMN. Ce nucléotide à pyridine peut être dosé après chromatographie liquide et détecté à 260 nm. Ce protocole est basé sur la mesure de l'activité UPRTase développée par Bertrand Gakière et décrite par [Mainguet \*et al.\*, \(2009\)](#). En revanche, en raison d'une faible activité de ces enzymes chez *Arabidopsis thaliana*, et par conséquent d'une très faible quantité de NaMN produit, une technique de détection plus sensible a été nécessaire, comme la spectrométrie de masse. Les nucléotides à pyridine, et notamment du NaMN, ont ainsi été quantifiés par LCMS. Le protocole développé au laboratoire fait l'objet d'une publication ([Guérard \*et al.\*, 2011](#)).

Les activités QPT et NaPT sont réalisées dans un mélange réactionnel final de 100 µL contenant 10 µL de quinolinate à 20 mM pour la QPT ou 10 µL de nicotinate à 20 mM pour la NaPT, 10 µL de PRPP à 20 mM et 20 µL de tampon d'activité (Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7.5). La réaction est amorcée par ajout de 60 µL de l'extrait ED. La réaction est incubée à 30 °C pendant 90 minutes et suivie toutes les 15 minutes. L'arrêt de la réaction se fait par chauffage à 100 °C pendant 2 minutes suivi d'une précipitation des protéines par centrifugation pendant 15 minutes à 4 °C et à vitesse maximale (14000 g). Les échantillons sont alors congelés à - 20 °C jusqu'aux analyses HPLC ou LCMS. Le NaMN formé au cours des réactions catalysées par la QPT ou les NaPT est quantifié par HPLC selon [Mainguet \*et al.\* \(2009\)](#). Une technique LCMS décrite plus loin a également été utilisée afin d'optimiser les résultats lorsque les niveaux d'activité étaient faibles ([Guérard \*et al.\*, 2011](#)). L'ensemble des produits réactionnels est fourni par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).



**Figure 42. Schéma réactionnel de la réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase.** Les plantes disposent de différents mécanismes pour ajuster la concentration et l'activité de la NR en réponse à divers signaux tels que l'abondance en nitrate, les métabolites azotés et carbonés, le CO<sub>2</sub>, les cytokinines et la lumière. Certaines protéines de type chaperonnes appelées 14-3-3 ont aussi la possibilité de moduler l'activité de la NR devenue phosphorylée sous l'effet de signaux environnementaux. Sous l'action de stimuli tels une diminution de l'intensité lumineuse ou de la diminution de la teneur en CO<sub>2</sub>, la NR est phosphorylée par une kinase. Une fois phosphorylée, et en présence de cations bivalents comme Mg<sup>2+</sup> ou Ca<sup>2+</sup>, un dimère de protéines 14-3-3 peut se fixer sur la NR et ainsi la rendre inactive. A l'inverse, sous l'action de sels, d'agents chélatants, ou de certains facteurs environnementaux, le complexe NR/14-3-3 se dissocie, libérant la NR sous forme active. D'après Crawford *et al.* (2000).

### C. Mesure de l'activité nitrate réductase

---

#### 1. Extraction

---

Environ 500 mg de feuilles sont broyées au mortier dans l'azote liquide en présence de 100 mg de sable de Fontainebleau, puis resuspendus dans 1.4 mL de tampon d'extraction A (HEPES 50 mM pH 7.6, Triton X 100 0.1 %, Leupeptine 10.8  $\mu$ M, PMSF 100  $\mu$ M, FAD 19.2  $\mu$ M, DTT 2.9 mM, PVP 1 %,  $MgCl_2$  5mM). Le broyat est transféré dans un tube Eppendorf puis clarifié par 10 minutes de centrifugation à vitesse maximale (14000 *g*) à 4 °C. L'activité NR est dosée sur le surnageant dessalé sur colonne NAP-5 dans un nouveau tube et homogénéisé. La concentration en protéines totales est réalisée sur une aliquote du surnageant.

#### 2. Mesure de l'activité extractible

---

La NR réduit les nitrates en nitrites qui peuvent se complexer avec le N-1-Naphtyléthylène diamine (NED) en milieu acide et développer une coloration rose. Deux dosages d'activité sont réalisés : l'activité NR endogène en présence de  $MgCl_2$  (apport de  $Mg^{2+}$ ) qui favorise la complexation de la NR phosphorylée avec une protéine 14-3-3 inhibitrice et l'activité NR maximale potentielle *in vitro* en présence d'EDTA. L'EDTA permet de chélater les cations bivalents et donc de dissocier le complexe 14-3-3/NR (**Figure 42**). La mesure de l'activité en présence de  $Mg^{2+}$  représente l'état d'activation de l'enzyme, encore appelée phosphorylation apparente, par rapport à l'activité maximale potentielle. Cette activité est exprimée en  $\mu$ moles de nitrites formés par heure et par mg de protéines solubles.

Le milieu réactionnel est constitué d'un tampon HEPES 50 mM pH 7.6, BSA 0.5 % (P/V) dans 350  $\mu$ L finaux avec 50  $\mu$ L d'extrait, 50  $\mu$ L de  $KNO_3$  à 100 mM (**Figure 43**). Pour mesurer l'activité endogène, 7.5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  à 0.5 M sont ajoutés, et pour l'activité maximale potentielle, 7.5  $\mu$ L d'EDTA à 148 mM. Le volume final est ajusté à 350  $\mu$ L finaux avec le

Tubes Réactifs	$T_{\text{Blanc}}$	$T_{\text{NR-Mg}}$ (3 fois)	$T_{\text{NR-EDTA}}$ (3 fois)	
Extrait	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	
$\text{MgCl}_2$ 0,5 M	-	7,5 $\mu\text{L}$	-	
EDTA 148 mM	-	-	7,5 $\mu\text{L}$	
$\text{KNO}_3$ 100 mM	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	
Tampon de mesure B	250 $\mu\text{L}$	242.5 $\mu\text{L}$	242.5 $\mu\text{L}$	$V_{\text{réacfinal}} = 350 \mu\text{L}$
$\text{ZnSO}_4$ 0,5M	50 $\mu\text{L}$	-	-	
$T_0 \rightarrow$ NADH 2 mM Temps de réaction	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	Pré-incubation 2 min à 30 °C Agiter au vortex 30 minutes
Arrêt $\text{ZnSO}_4$ 1 M	-	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	Agiter au vortex
Sulfanilamide 1.5 %	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	
NNED 0.02 %	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	$V_{\text{total}} = 1450 \mu\text{L}$

**Figure (Tableau) 43. Conditions réactionnelles pour la mesure de l'activité NR.** Pour les abréviations, voir dans le texte.

tampon B soit 250  $\mu\text{L}$  pour le blanc (**Figure 43**) et 242.5  $\mu\text{L}$  pour l'activité endogène et maximale. Le blanc réactionnel contient en plus 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{ZnSO}_4$  à 0.5 M (**Figure 43**). Ce mélange réactionnel est préincubé pendant 2 minutes à 30 °C, puis la réaction est initiée par ajout de 50  $\mu\text{L}$  de NADH à 2 mM. Après agitation, l'incubation est réalisée pendant 30 minutes. Toutes les 5 minutes, 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{ZnSO}_4$  à 1 M sont ajoutés pour stopper la réaction, ainsi que 500  $\mu\text{L}$  de sulfanilamide à 1.5 % (dans HCl 1.5 N). Les nitrites sont ensuite révélés par coloration avec 500  $\mu\text{L}$  de solution aqueuse NNED à 0.02 % et le tube est vortexé. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, l'échantillon est clarifié par centrifugation pendant 5 minutes à vitesse maximale. L'absorbance est mesurée sur le surnageant à 540 nm contre le blanc (**Figure 43**). Le dosage des nitrites est réalisé en référence à une gamme étalon réalisée à partir d'une solution de  $\text{NaNO}_2$  à 100  $\text{nmol.mL}^{-1}$ .

## XI. Techniques d'études métaboliques

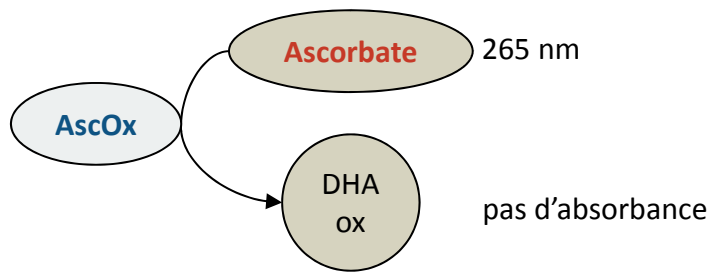
---

### A. Dosage du pool d'antioxydants cellulaires

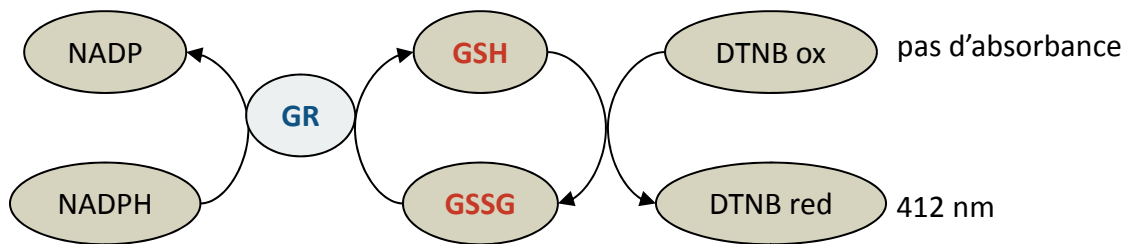
---

Les dosages de métabolites aux propriétés antioxydantes comme les nucléotides à pyridine, le glutathion et l'ascorbate sont réalisés par spectrophotométrie *via* un couplage enzymatique (**Figure 44**). L'utilisation d'un lecteur de microplaque (type Multiskan spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) permet de réaliser sur un seul extrait simultanément toute une batterie de dosage d'antioxydants (NAD, NADP, GSH, GSSG, ascorbate réduit et total, phéophytines) avec un seuil de détection en dessous de la picomole. Les thiols sont analysés par technique chromatographique HPLC. Tous les réactifs ont été fournis par la société Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), sauf exception.

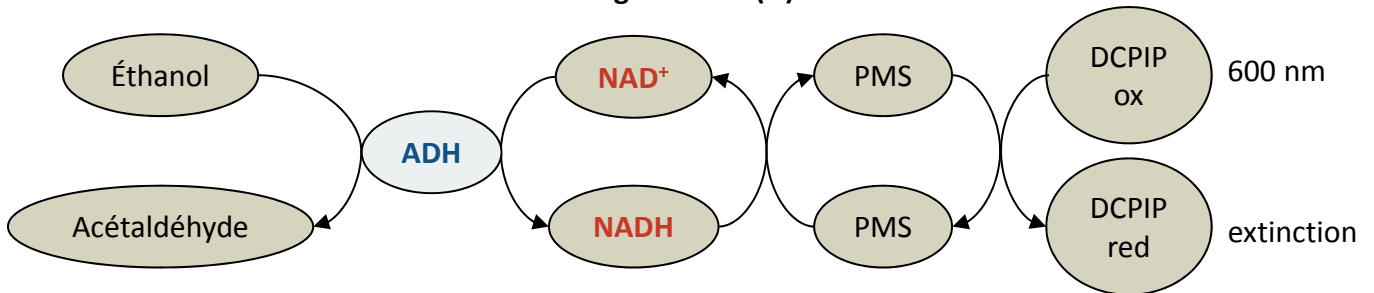
### Dosage de l'ascorbate



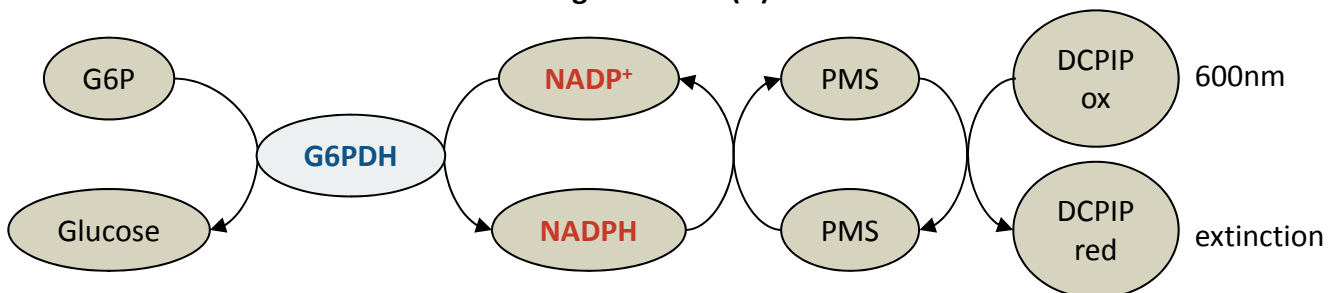
### Dosage du glutathion



### Dosage du NAD(H)



### Dosage du NADP(H)



**Figure 44. Principes des dosages colorimétriques des antioxydants libres cellulaires.** ADH : alcool déshydrogénase ; AscOx : ascorbate oxydase ; DCPIP : 2,6-dichlorophénol-indophénol ; DHA : dihydroxyascorbate ; G6P : glucose 6-phosphate ; G6PDH : glucose 6-phosphate déshydrogénase ; GR : glutathion réductase ; PMS : phénazine méthosulfate. ; ox : forme oxydée ; red : forme réduite.

### 1. Extraction acide

---

Environ 100 mg de feuilles sont broyées au mortier dans l'azote liquide, auxquels 1 mL de HCl 0.2 N est ajouté. Après décongélation du broyat, celui-ci est transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL et une aliquote (50  $\mu$ L) est prélevée pour le dosage des phéophytines. L'extrait est ensuite clarifié par centrifugation pendant 10 minutes à 14000 *g*, à 4 °C. Le surnageant est séparé en deux aliquotes : l'une servant au dosage de l'ascorbate, du glutathion et des composés thiolés, l'autre au dosage du NAD(P). Dans un premier tube, 500  $\mu$ L de surnageant sont neutralisés en ajoutant 50  $\mu$ L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM pH 5.6 et un volume suffisant de NaOH 0.2 M (environ 400  $\mu$ L) pour atteindre un pH 5 - 6. Le volume exact rajouté est noté. Dans un deuxième tube, 200  $\mu$ L de surnageant sont chauffés pendant 1 minute à 100 °C, puis neutralisés en ajoutant 20  $\mu$ L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM pH 5.6 et un volume suffisant de NaOH 0.2 M (environ 200  $\mu$ L) pour atteindre un pH 7. Ce deuxième tube sert à la quantification du NAD(P). Le premier tube permettra de doser les autres antioxydants cellulaires sus-cités. Pour chaque échantillon, les deux tubes sont précautionneusement gardés dans la glace.

### 2. Extraction alcaline

---

Pour le dosage des formes réduites NADH et NADPH, une extraction alcaline est nécessaire. De la même manière que pour l'extraction acide, 100 mg de feuilles sont broyées au mortier dans l'azote liquide puis 1 mL de NaOH 0.2 M est ajouté. Le mélange est ensuite centrifugé 10 minutes à 14000 *g* à 4 °C. 200  $\mu$ L de surnageant sont chauffés pendant 1 minute à 100 °C, puis neutralisés en ajoutant 20  $\mu$ L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM pH 5.6 et un volume suffisant de HCl 0.2 N (environ 150  $\mu$ L) pour atteindre un pH 7.





### 3. Dosage des chlorophylles dégradées : les phéophytines

---

Les chlorophylles extraites dans l'acide sont dégradées et libèrent leur atome de Mg pour former des phéophytines qui peuvent être quantifiées. 50 µL d'extrait non centrifugé sont mélangés à 1.2 mL d'acétone 80 % V/V. Les tubes sont mis à reposer pendant 2 h à 4 °C à l'obscurité, puis centrifugés 10 minutes à 14000 g. L'absorbance (DO) est ensuite lue à 666 et 655 nm. La concentration en phéophytines dans la cuve (en µg.mL<sup>-1</sup>) est ensuite estimée par la formule suivante :  $(6.75 \times DO_{666}) + (26.03 \times DO_{655})$ , en tenant compte du facteur de dilution.

### 4. Dosage des nucléotides à pyridine

---

#### a) *NAD<sup>+</sup> et NADH*

---

Les formes oxydée et réduite sont séparées respectivement par extraction acide ou alcaline. Ces deux formes sont quantifiées par une réaction de recyclage en suivant la réduction du DCPIP (2,6-dichlorophénol-indophénol) à 600 nm en présence d'alcool déshydrogénase (ADH, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et d'éthanol (Monéger *et al.*, 1977) (Figure 44). Sur une plaque de 96 puits, la première ligne est utilisée pour quatre points d'une gamme standard de NAD<sup>+</sup> ou NADH, le reste pour le dosage des échantillons. Chaque échantillon ou standard est réalisé en triplicat. Dans chaque puits, sont ajoutés dans cet ordre 100 µL de tampon HEPES 100 mM/EDTA 2 mM pH 7.5, 20 µL de DCPIP 1.2 mM, 10 µL de PMS (phénazine méthosulfate) 10 mM et 10 µL d'ADH (25 U) dans un volume final de 200 µL. Le NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> est ajouté à la gamme standard. Pour les échantillons à tester, 20 µL d'extrait et 25 µL d'eau bidistillée sont ajoutés. Après agitation de la plaque, la réaction est initiée par ajout de 15 µL d'EtOH absolu. Les mesures de NAD sont réalisées à 600 nm par le lecteur de microplaque Multiskan Spectrophotometer et le logiciel Multiskan Lab (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). La quantification du NAD(H) est effectuée par référence à la gamme étalon.



### b) NADP<sup>+</sup> et NADPH

---

Un dosage par couplage enzymatique peut également être utilisé pour doser les formes réduites et oxydées du NADP. La réaction de recyclage se base sur la réduction du DCPIP à 600 nm en présence de deux unités de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6DPH, Roche Applied Science (Meylan, France) et de glucose-6-phosphate (G6P) (Monéger *et al.*, 1977) (Figure 44). Sont mélangés 20 µL d'extrait à 100 µL de tampon HEPES 100 mM/EDTA 2 mM pH 7.5, 20 µL de DCPIP 1.2 mM, 10 µL de PMS 20 mM dans un volume final de 200 µL. La réaction est amorcée par l'ajout de 10 µL de G6P 10 mM et suivie à 600 nm et 25 °C pendant 5 minutes. La concentration en NADP(H) est calculée à partir de standards mesurés de la même façon.

### 5. Dosage de l'ascorbate

---

L'ascorbate réduit montre un pic d'absorption dans la région ultraviolet absent chez la forme oxydée déshydroascorbate (DHA). Il peut se mesurer par spectrophotométrie à 265 nm (Foyer *et al.*, 1983 ; Veljovic-Jovanovic *et al.*, 2001) (Figure 44). Pour distinguer entre l'ascorbate et d'autres composés absorbants dans cette région du spectre, les valeurs d'absorbance sont comparées avant et après traitement d'échantillons à l'ascorbate oxydase (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). 40 µL d'extrait sont dosés dans un volume final de 200 µL contenant 100 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 5.6. Une première lecture de l'absorbance est réalisée, puis 0.2 U d'ascorbate oxydase est ajouté. La décroissance de l'absorbance est alors suivie à 25°C pendant 5 minutes. La différence entre les deux mesures permet d'estimer la quantité d'ascorbate réduit. La concentration en ascorbate est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire de l'ascorbate  $\epsilon_{265}=14 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

Pour ce qui est de l'ascorbate total (ascorbate réduit + DHA), 100 µL d'extrait sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante en présence de 140 µL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 120 mM pH 7.5 et 10 µL de DTT 25 mM avant le dosage. Le DTT, puissant réducteur, permet de réduire tout le pool d'ascorbate présent, qui reflètera ainsi le pool total.



## 6. Dosage du glutathion

---

Les formes réduite (GSH) et oxydée (GSSG) du glutathion sont dosées par une réaction de recyclage en suivant la réduction du DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate ou réactif d'Ellman, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à 412 nm par le glutathion en présence de glutathion réductase (GR, Roche Applied Science (Meylan, France) et de NADPH (Queval et Noctor, 2007) (Figure 44). 10  $\mu$ L d'extrait sont mélangés à du  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM (pH 7.5), EDTA 5 mM, DTNB 0.6 mM, NADPH 0.5 mM dans un volume final de 200  $\mu$ L. La réaction est initiée par l'ajout de 0.2 U de GR et suivie à 412 nm et 25 °C pendant 5 minutes. La concentration en glutathion est calculée à partir de standards de GSH.

Le même dosage par couplage enzymatique permet de doser le GSSG sur 20  $\mu$ L d'extrait. Sont d'abord incubés 200  $\mu$ L d'extrait en présence de 2  $\mu$ L de 2-vinylpyridine pendant 30 minutes à température ambiante, puis deux centrifugations successives sont effectuées pendant 15 minutes chacune à 14000  $g$  à 4°C. Les standards de GSSG sont traités de la même manière que les extraits.

### B. Dosage des composés thiolés

---

Les thiols solubles sont extraits par extraction acide (HCN 0.2 N, comme pour les autres antioxydants). Le monobromobimane (mBB) réagit spécifiquement avec les fonctions thiols libres ce qui permet une détection très sensible des métabolites thiolés par fluorimétrie (Fahey et Newton, 1987). Sont mélangés 200  $\mu$ L d'extrait neutralisé à 100  $\mu$ L de Tampon CHES [acide (N-cyclohexylamino) éthanesulfonique, 0.2 M pH 9], 20  $\mu$ L de DTT 10 mM et incubés pendant 30 minutes à température ambiante. Sont ensuite ajoutés 20  $\mu$ L du réactif THIOLYTE® à 30 mM qui contient du mBB (Calbiochem, Merck Chimie, Fontenay sous Bois, France). L'incubation se poursuit 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. La réaction est stoppée par ajout de 660  $\mu$ L d'acide acétique 10% (V/V), puis le mélange est centrifugé 10 minutes à 14000  $g$  à 4°C. 900  $\mu$ L du surnageant sont filtrés à l'aide d'une seringue surmontée d'un filtre à 0.2  $\mu$ m, puis placés dans un vial (12 x 32 mm, Waters,



Guyancourt, France). 50  $\mu\text{L}$  sont injectés dans l'HPLC pour l'analyse. Les conditions chromatographiques sont les suivantes : séparation des dérivés fluorescents du bimanane par gradient isocratique (10 % V/V de méthanol et 0.25 % V/V d'acide acétique pH 4.3) avec un débit de 0.8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; colonne phase inverse C18 (Symmetry C18 3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm, Waters, Guyancourt, France), thermorégulée à 40 °C ; détection par fluorimétrie ( $\lambda_{\text{ex}}$  : 380 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  : 480 nm). L'HPLC utilisée est une Alliance de chez Waters (module de séparation 2695 et fluorimètre 2475, Guyancourt, France). Les dérivés sont identifiés et quantifiés par rapport à une courbe étalon de standards. Cette technique permet de détecter la cystéine (temps de rétention 6.5 min), la cystéine-glycine (7.1 min), le  $\gamma$ -glutamyl-cystéine (10 min), l'homocystéine (11.8 min) et le glutathion (12.2 min).

### C. Extraction des fractions solubles aqueuses foliaires

---

La fraction soluble est extraite suivant le protocole modifié par Tcherkez *et al.* (2003). A 500 mg de MF ou 100 mg de MS est ajouté 1 mL d'eau bidistillée, puis l'ensemble est broyé au mortier dans l'azote liquide. Le broyat est ensuite clarifié par centrifugation à 4 °C à 14000  $g$  pendant 10 min. Le surnageant est récupéré et les protéines thermolabiles sont dénaturées par une ébullition de 5 minutes. Les protéines dénaturées sont précipitées par centrifugation de 10 min à 4 °C à 12000  $g$ . Le surnageant récupéré constitue la fraction soluble et peut être conservé à - 20 °C jusqu'aux analyses.

### D. Mesure des ions nitrate

---

Les ions nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) sont mesurés sur les fractions solubles grâce à une sonde à nitrates (Modèle CI-6735, Pasco scientific, USA) reliée à un pHmètre/ionomètre (pH 5500, Cyberscan, Eutech Instrument, Germany). La calibration de l'électrode s'effectue à partir d'une gamme étalon obtenue par dilution de solutions de nitrate de sodium (0.002 à 0.2 M). Pour chaque échantillon, 500  $\mu\text{L}$  de fraction soluble sont dilués au 1/20ème afin d'obtenir un volume suffisant pour plonger l'électrode. Toutes les solutions préparées (échantillons et





gamme étalon) sont laissées le temps suffisant à ce que toutes les solutions aient la même température. La stabilité des mesures est vérifiée tous les 5 échantillons par passage d'une solution standard de concentration connue.

### E. Mesure des ions ammonium

---

La mesure des teneurs en ions ammonium est également réalisée sur les fractions solubles à l'aide d'une sonde sélective à ammonium (Ammonium ISE DX218 Ion-Selective Electrode, Metler Toledo, Switzerland) couplée à une sonde de référence (Inlab Reference Pro, Metler Toledo, Switzerland). De la même manière que pour les nitrates, le dosage de l'ammonium est établi par référence à une gamme étalon.

### F. Dosage de l'acide salicylique

---

#### 1. Extraction

---

Entre 100 et 200 mg de feuilles sont échantillonnés en double par condition (par génotype, par temps de cinétique et par traitement) afin de doser les pools libres et totaux de SA, scopolétine et camaléxine. Chaque échantillon est broyé dans l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à billes (1 minute, 30 Hz). Le rendement de l'extraction est évalué par ajout d'une quantité connue de SA marqué au  $[^{14}\text{C}]$  (SA\*) (1 nCi, 54 mCi mmole<sup>-1</sup>, NEN) à chaque échantillon. Cette quantité ajoutée est inférieure au seuil de détection du SA en HPLC. L'échantillon est alors extrait avec une solution de méthanol 90 % V/V (250 µL pour 100 mg de MF), vortexé quelques secondes puis centrifugé 15 minutes à 10000 g. Les surnageants sont récupérés et conservés à température ambiante. Les culots sont à nouveau extraits avec la même quantité de méthanol 100 %, vortexés quelques secondes puis centrifugés 15 minutes à 10000 g. Les nouveaux surnageants sont récupérés, additionnés aux premiers, séchés au concentrateur sous vide (speed-vacuum) (environ 4 h). A ce stade, un extrait



servant au dosage du pool libre de SA (SAL) ou de la scopolétine (ScopoL) et camaléxine (CamaL) est conservé à l'obscurité dans un dessiccateur (d'après [Simon et al., 2010](#)).

### 2. Hydrolyse acide

---

Afin de déterminer le pool total de SA (SAT) et Scopolétine (ScopoT), une hydrolyse acide est nécessaire. Les extraits secs correspondant au dosage SAT ou ScopoT sont repris dans 450  $\mu\text{L}$  d'eau bidistillée et 150  $\mu\text{L}$  d'HCL 12 N (concentration finale en HCL de 3 N). Les tubes sont ensuite incubés pendant 45 minutes à 80 °C, puis refroidis. Chaque extrait est additionné d'1 mL d'éther, puis vortexé pendant 15 secondes et centrifugé 30 secondes à 14000  $g$ . La phase organique est récupérée (partition de phase). Les cônes peuvent être mouillés à l'éther propre avant prélèvement. Une deuxième partition de phase est effectuée avec 1 mL d'éther. La deuxième phase organique est prélevée et mélangée à la première, puis le mélange est alors évaporé sous flux d'azote (d'après [Bednarek et al., 2005](#)).

### 3. Quantification des pools libres et totaux

---

Chaque résidu sec est dissout dans 200  $\mu\text{L}$  d'un mélange acétate de sodium 20 mM pH 5/acétonitrile (ACN, VWR, Fontenay sous Bois, France), 90/10 (V/V). Chaque échantillon est injecté (50  $\mu\text{L}$ ) dans un système HPLC Waters system (1525 Binary HPLC pump, TCM Heater, 2475 Multi  $\lambda$  Fluorescence Detector, 2996 Photodiode Array Detector, 717 Autosampler, Waters, Guyancourt, France) de paramètres suivants : colonne C18 Nova-Pak 4  $\mu\text{m}$  (150 x 3.9 mm, Waters, Guyancourt, France) ; gradient acétate de sodium 20 mM pH 5 (A) et ACN (B) : A, 97 % à 0 min, 97 % à 10 min, 20 % à 20 min, 20 % à 30 min, 97 % à 32 min; détection par fluorimétrie ( $\lambda_{\text{em}} = 315 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ). Les données sont analysées grâce au logiciel Empower Pro Software (Waters, Guyancourt, France). Le SA est quantifié par référence à une gamme de standards.



### 4. Calcul du rendement de l'extraction par comptage radioactif

---

Une aliquote des échantillons repris dans le tampon de charge est utilisé pour le comptage du SA marqué au [ $^{14}\text{C}$ ] (SA\*). Pour 2000 cpm maximums attendus, 1,4 mL de liquide scintillant sont ajoutés aux aliquotes précédentes. Le comptage radioactif est effectué dans un compteur à scintillation (type LS 6000IC, Beckman, Villepinte, France). Chaque échantillon est analysé trois fois dix minutes, puis le rendement est obtenu par calcul de la moyenne des trois comptages.

### 5. Calcul des pools conjugués

---

Le SA peut être glycosilé sous forme de Glu-SA lorsqu'il est inactivé. Les quantités de ce conjugué sont déterminées par différence entre le pool total et le pool libre.

## G. Dosage des acides aminés par technique HPLC

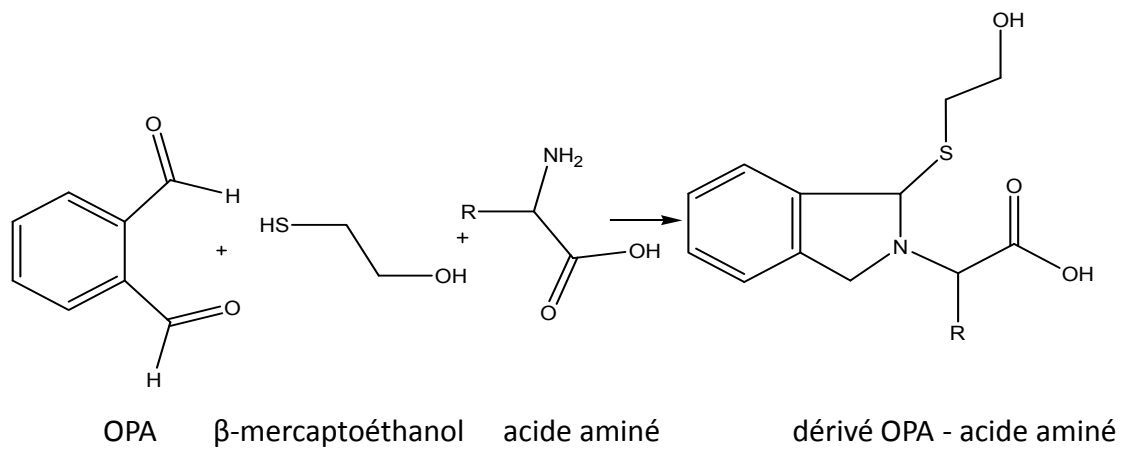
---

La Plateforme Métabolisme-Métabolome (PMM) présente sur le site de l'Institut de Biologie des Plantes à Orsay dispose d'un appareillage polyvalent permettant des études métabolomiques variées. Caroline Mauve et Florence Guérard, ingénieurs d'études sur la PMM, ont participé à certaines étapes des analyses métabolomiques présentées dans ce travail de thèse.

### 1. Extraction méthanolique des métabolites

---

Environ 100 mg de plantes (fraîches) sont broyées au mortier dans l'azote liquide. Après obtention d'une fine poudre, 1 mL de méthanol 80 % et 1 mL d'acide  $\alpha$ -



**Figure 45. Dérivatation des acides aminés à l'*O*-phthalaldéhyde (OPA).** En présence de β-mercaptoéthanol, les acides aminés traités à l'OPA produisent des dérivés fluorophores OPA – acides aminés détectables en fluorimétrie ( $\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$ ).

aminobutyrique ( $\alpha$ -ABA) 0.2 mM sont ajoutés. L' $\alpha$ -ABA constitue le premier étalon interne. Après mélange, le broyat est transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL et clarifié par 15 minutes de centrifugation à 14000  $g$  à 4°C. 1500  $\mu$ L de surnageant sont récupérés et 75  $\mu$ L de ribitol 2 mM sont ajoutés (second étalon). Après une nouvelle centrifugation de 15 minutes à 14000  $g$  à 4°C, le surnageant est aliquoté en 3 fois 0.2 mL et 1 fois 0.4 mL. Les différentes aliquotes sont séchées au speed-vacuum toute une nuit et conservés à -80°C.

## 2. Quantification absolue des acides aminés en HPLC

---

Pour faciliter la détection de petites molécules comme les acides aminés, les analystes et biologistes ont développé des techniques chimiques basées sur la dérivation des métabolites à analyser suivie d'une séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La réaction des acides aminés avec l'*O*-phthalaldéhyde (OPA) en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Lindroth et Mopper, 1979) produit un dérivé fluorophore OPA-acide aminé (**Figure 45**) qui émet une fluorescence détectable par un fluorimètre en sortie de chromatographie ( $\lambda_{em} = 360$  nm,  $\lambda_{ex} = 450$  nm).

### a) Dérivatisation des échantillons

---

L'OPA est préparé dans du méthanol (environ 15 mg d'OPA solubilisés dans 200  $\mu$ L de MeOH). Sont ensuite ajoutés 1.8 mL de tampon borate de sodium 0.5 M, pH 9.5 et 40  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Le mélange est alors filtré à l'aide d'une seringue luer-lock 1mL et d'un microfiltre Minisart RC4 dans un vial (12 x 32 mm, Waters, Guyancourt, France).





### *b) Conditions chromatographiques*

---

La phase mobile utilisée pour la séparation des acides aminés est composée de deux tampons d'élutions, tampon A : méthanol/acétate de sodium 50 mM, pH 5.9 20/80 (V/V), 1 % de tétrahydrofurane (THF) (V/V) et tampon B : méthanol/acétate de sodium 50 mM, pH 5.9 80/20 (V/V). Une fois préparés, les tampons sont filtrés (filtres type GSWP 0,22 µm pour solvant aqueux et GVHP 0.22 µm pour solvant organique, Millipore, Molsheim, France) à l'aide d'une pompe à vide. La colonne utilisée est une colonne phase inverse C18 (Symmetry C18 3.5 µm, 4.6 x 150 mm, Waters, Guyancourt, France) thermorégulée à 40 °C. L'HPLC utilisée est une Alliance de chez Waters (module de séparation 2695 et fluorimètre 2475, Guyancourt, France).

### *c) Préparation des solutions d'acides aminés standards*

---

Trois classes d'acides aminés se distinguent en fonction de leur concentration dans les tissus végétaux. La première classe traduit les composés les plus abondants dans les tissus végétaux et se compose de : Glu, Gln, Asp, Asn, Ala, Thr, Gly, Ser, α-ABA. Les acides aminés d'abondance moyenne dans la matrice végétale comprennent : Val, Leu, Ile, Beta-Ala, hSer, Phe (deuxième classe). Les composés dont l'abondance est la plus faible sont : Met, γ-ABA, His, Lys, Tyr, Trp, Arg, O-AcSer, Orn. Trois gammes étalons correspondant aux trois classes d'acides aminés sont réalisées séparément.

### *d) Préparation des échantillons*

---

Une aliquote de 0.2 mL issue de l'extraction méthanolique pour chaque échantillon est resuspendue dans 0.3 mL d'eau bidistillée, puis filtrée à l'aide d'une seringue de microinjection (Luer Lock, Phenomenex, Le Pecq, France) de 1 mL terminée par un



microfiltre Minisart RC4 (Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France). Le filtrat est transféré dans un vial (12 x 32 mm, Waters, Guyancourt, France).

### e) Conditions d'injection des standards et échantillons

---

L'injecteur prélève 10  $\mu\text{L}$  de standard ou d'échantillon puis 10  $\mu\text{L}$  d'OPA. Après une incubation de 2 minutes dans la boucle d'injection, l'injection démarre. La séparation des dérivés (40 °C, 0.8 mL.min<sup>-1</sup>) s'effectue selon le gradient : 0-1 min, 0 % B ; 6-11 min, 14 % B ; 16-20 min, 50 % B ; 32-36 min, 100 % B et 37-42 min, 0 % B. Le logiciel utilisé pour les analyses est Empower (Waters, Guyancourt, France).

## H. Profilage métabolique par technique GCMS

---

### 1. Extraction méthanolique des métabolites

---

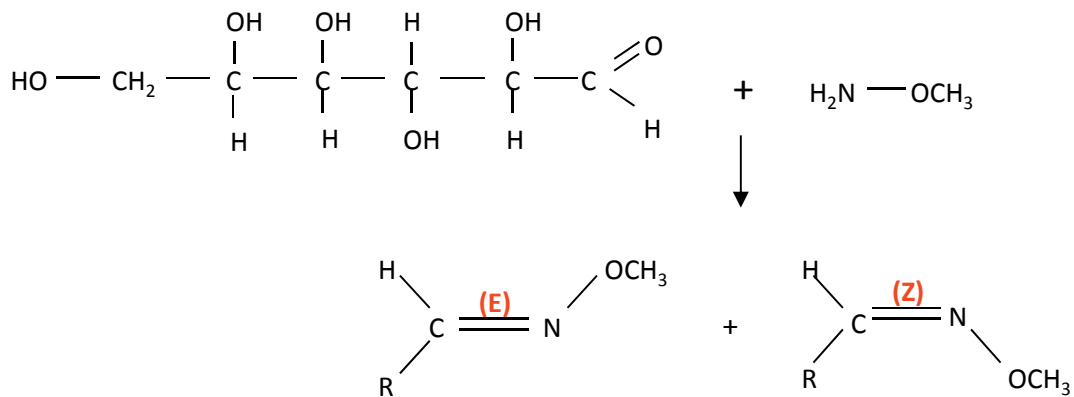
L'extraction des métabolites préparatoire à l'analyse en GCMS est commune à celle décrite ci-dessus pour le dosage des acides aminés en HPLC. Ceci permet de travailler sur les mêmes extraits.

### 2. Préparation du réactif de métoxylation et du mélange d'alcane

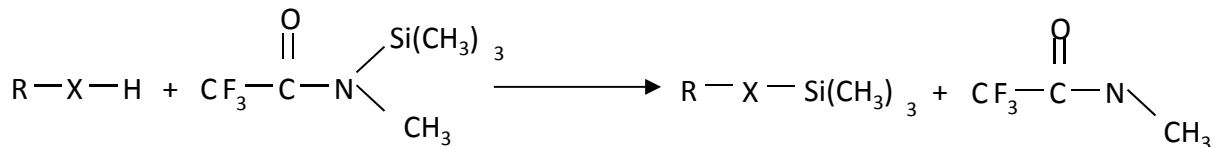
---

La métoxylation est une technique de dérivation qui empêche les échantillons de former des énols instables. Une solution de méthoxyamine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à 20 mg.mL<sup>-1</sup> est préparée dans de la pyridine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). La solution peut être conservée pendant deux semaines à température ambiante.

## La méthoxylation



## La silylation



**Figure 46. Double dérivation des échantillons destinés au profilage métabolique en GCMS.** On utilise le processus de silylation qui remplace un hydrogène acide en groupement TMS (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), rendant ainsi la molécule moins polaire et plus volatile. Les atomes d'hydrogène actifs sont présents dans de nombreux groupes fonctionnels : alcools, thiols, amines, amides, imines et acides carboxyliques avec pour ordre de réactivité : alcools > phénols > acides carboxyliques ~ amines > amides. Les aldéhydes et cétones existent en équilibre avec leur forme *énol* qui peut être dérivée par silylation (TMS). Cela conduit à des dérivés instables et il est préférable d'utiliser la méthoxylation avant l'ajout d'agent de silylation, de façon à convertir les énols en oxymes. E : configuration *entgegen*, opposée. Les groupes prioritaires sont du côté opposé l'un de l'autre par le plan formé par la double liaison. Z : configuration *zusammen*, ensemble. Les groupes prioritaires sont du même côté du plan formé par la double liaison.

Une solution d'alcane est nécessaire pour le calcul des indices de rétention des composés qui sont élués en GC. Ils permettent une meilleure identification chromatographique par comparaison avec des bases de données. Les alcanes utilisés sont les suivants : décane, pentadécane, octadécane, nonadécane, docosane, octacosane, doxtriacontane et hexatriacontane (Fluka). Un mélange d'alcane à 7 mM pour le décane et 1.4 mM pour chaque autre alcane est préparé.

### *a) Double dérivation des échantillons*

---

Deux dérivations successives sont réalisées sur les échantillons (**Figure 46**). La méthyoxymation consiste à réduire le groupement carbonyle et éviter la formation de sucres sous forme cyclique. Cette réaction donne lieu à la formation de stéréoisomères (isomères trans (E) et cis (Z)). En silylation, les protons labiles sont remplacés par un groupe alkylsilyl tel que le triméthylsilyl, noté TMS. Cette technique permet ainsi d'abaisser la température d'ébullition en éliminant des groupes polaires tels que COOH, OH, NH<sub>2</sub>, SH, etc. Les dérivés obtenus sont moins polaires donc plus volatiles, ce qui facilite leurs analyses en GC.

Pour chaque échantillon (une aliquote de 0.2 mL), 50 µL de solution de méthyoxamine sont ajoutés. L'échantillon est vortexé puis incubé pendant 90 minutes à 30 °C sous agitation. 80 µL de N-méthyl-N-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide (MSTFA) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) sont ajoutés et laissés 30 minutes à 37 °C sous agitation constante. Une incubation de 2 heures à température ambiante est ensuite réalisée. Moins de 20 minutes avant l'injection, l'échantillon est transféré dans un vial (12 x 32 mm, Agilent, Massy, France) contenant un insert (150 µL, 5 x 28 mm, Agilent, Massy France) auquel 10 µL de la solution d'alcane sont ajoutés.



### b) Méthode GCMS

---

Un appareil Agilent 6890 est utilisé pour le passage automatique des échantillons. L'injection est réalisée sur 1  $\mu\text{L}$  à l'aide d'une seringue de 10  $\mu\text{L}$ . La colonne chromatographique utilisée pour la méthode GC est de type RTX5 (longueur 40 m, diamètre 250  $\mu\text{m}$  et épaisseur 0.25  $\mu\text{m}$ ). La température maximale utilisée est 360 °C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium, à un débit de 0.7  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . La vitesse d'acquisition est de 20 Hz et la rampe de température se fait selon la méthode suivante : 2 minutes à 80 °C suivi d'une augmentation de 15  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  jusqu'à 330 °C pendant 6 minutes.

Le spectromètre de masse utilisé est un Pegasus III (Leco, St Joseph, USA) qui permet un taux d'acquisition de 20 spectres par seconde. Les cartes de chaleur et analyses en composantes principales (PCA) sont réalisées avec le logiciel MeV, les tests statistiques avec le logiciel SigmaStats.

#### I. Quantification ciblée de nucléotides et cofacteurs par LCMS

---

La technique présentée ici a été développée par Florence Guérard et fait l'objet d'une publication à laquelle j'ai contribué (Guérard *et al.*, 2011).

##### 1. Extraction perchlorique des métabolites

---

Environ 200 à 500 mg de matière fraîche congelée sont broyés au mortier dans l'azote liquide dans 1 mL de solution d'extraction (acide perchlorique à 17 % (V/V), Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Après décongélation, le broyat est transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL puis clarifié par centrifugation pendant 20 minutes à 14000  $g$  à 4 °C. Le surnageant est ensuite récupéré et aliquoté dans deux tubes avec un volume





d'environ 550  $\mu\text{L}$  chacun (une aliquote pour la pré-purification, l'autre sera séchée directement au speed-vacuum).

### 2. Neutralisation des extraits

---

Une étape de neutralisation est effectuée comme pour l'extraction du pool d'antioxydants libres. Dans tous les surnageants récupérés précédemment sont ajoutés 60  $\mu\text{L}$  d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) saturée. L'extrait est ensuite neutralisé jusqu'à pH 7 avec une solution de bicarbonate de potassium ( $\text{KHCO}_3$ ) saturée. Le mélange est alors centrifugé pendant 20 minutes à 14000  $g$  à 4 °C, puis le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 2 mL.

### 3. Pré-purification des échantillons par extraction en phase solide (SPE)

---

La pré-purification des échantillons se fera en deux temps par différentes extractions en phase solide (SPE) à l'aide de cartouches Strata X-C et Stata X-AW (Phenomenex, Le Pecq, France). Avant chargement de l'échantillon, la cartouche SPE Strata X-C est d'abord conditionnée pour que les chaînes carbonées de la phase solide soient dépliées. A un débit de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 1 mL de méthanol est élué sur la cartouche, puis 1 mL d'eau bidistillée. Le débit se règle à l'aide du robinet du vide de la paillasse, puis est vérifié à l'aide du manomètre du manifold. Les éluats ne sont pas récupérés, ils vont à la poubelle. 10  $\mu\text{L}$  d'acide phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à 50 % (V/V) sont ajoutés aux extraits chargés ensuite sur la cartouche Strata-X-C (débit 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), préalablement conditionnée au méthanol, puis à l'eau bidistillée. La fraction chargée est collectée dans un tube. La cartouche est alors lavée avec 1 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  à 0.1 % (V/V) et la fraction de lavage est collectée. L'élution est réalisée en trois étapes : 0.5 mL d'un mélange d'hydroxyde d'ammonium (28 %,  $\text{NH}_3$ )/MeOH/Eau bidistillée (5/25/70, V/V/V), 0.5 mL (10/25/65) et 2 fois 0.5 mL (20/25/55) ; débit 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . L'éluat est collecté dans un tube



Eppendorf. Les fractions de chargement et de lavage sont réunies, auxquelles 500  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate (0.1 M) sont ajoutés. La fraction tamponnée ainsi obtenue est chargée à un débit de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  sur la cartouche Strata-X-AW préalablement conditionnée avec un mélange acide formique/MeOH/Eau bidistillée (2/25/73, V/V/V). La cartouche est ensuite lavée avec 1 mL de tampon phosphate. L'élution est réalisée par trois mélanges  $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  : 0.5 mL 5/25/70 (V/V/V), 0.5 mL à 10/25/65 et 2 fois 0.5 mL à 20/25/55; débit  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Les éluats de cette étape sont récupérés dans des tubes Eppendorf de 2 mL.

A la fin du protocole opératoire, trois fractions sont générées pour chaque échantillon : une aliquote après l'extraction perchlorique (extrait brut), la fraction d'élution de la SPE Strata X-C et la fraction d'élution de la SPE Strata X-AW. Les trois fractions seront filtrées sur des filtres seringues (type Minisart RC4, Sartorius Stedim, Aubagne, France), puis évaporées au speed-vacuum. Après séchage, les échantillons sont directement analysés ou conservés à  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 4. Analyses LC-TOF

---

Les extraits secs sont resuspendus dans 100  $\mu\text{L}$  d'acétate d'ammonium (pH 6.8, 5 mM), puis clarifiés par centrifugation pendant 20 minutes à 8000  $g$  et à  $4^\circ\text{C}$ . Le surnageant est transféré dans un vial (Agilent Technologies, Germany). 10  $\mu\text{L}$  d'Ara-C (cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside, 0.1 mM) sont additionnés comme standard interne. Les échantillons sont injectés *via* le système UPLC Acquity équipé d'une colonne UPLC-HSS T3 (2.1 x 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) (Waters, Guyancourt, France) sous un gradient d'acétate d'ammonium/méthanol (99/1-0/100%, 6 min). L'UPLC est connectée à l'orifice d'injection du spectromètre de masse *via* un tube capillaire et une vanne 6 voies. Le débit est de  $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . La spectrométrie de masse par ionisation électrospray (ESI-MS) est réalisée à l'aide d'un appareil MicroTOF II (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) en utilisant du  $\text{N}_2$  ( $195^\circ\text{C}$ ,  $8.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4 bars) comme gaz de spray et sous ionisation positive (tension capillaire de + 3700 V) et négative (- 4500 V) (tension de l'interface - 500 V). Les paramètres de résolution ont été ajustés afin d'obtenir



une précision de masse optimale dans la gamme (de masse) 50-800 m/z. Les spectres de masse sont enregistrés à une fréquence d'acquisition de 40 Hz. L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés avec les logiciels MicrOTOF-Control et Data-Analysis (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Chacun des métabolites analysés par cette technique a été mesuré et quantifié par référence à des standards purs (obtenus auprès de Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

#### J. Lyophilisation des échantillons et calcul du rapport MS/MF

---

La lyophilisation d'échantillons de feuilles ou de racines a été réalisée d'une part pour le calcul du rapport MS/MF (masse sèche/masse fraîche) et d'autre part pour l'analyse isotopique du pourcentage d'azote et du  $^{15}\text{N}$ . Une masse fraîche connue (environ 500 mg) de tissu végétal est prélevée puis lyophilisée à l'aide d'un lyophilisateur (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Une fois sec, le même échantillon est pesé, puis le rapport MS/MF calculé.

#### K. Analyses par couplage EA-IRMS

---

L'EA-IRMS se compose d'un analyseur élémentaire (EA) couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS) (type NA1500, Carlo Erba, GV Instruments, UK). L'analyseur élémentaire (EA) permet de séparer l'azote et le  $\text{CO}_2$  gazeux issus des échantillons après combustion, réduction puis passage dans une colonne de chromatographie gazeuse. Le spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS) est un instrument destiné à séparer les ions et les molécules chargés d'un échantillon suivant leur masse. Les gaz séparés sortent de l'EA, entrent dans l'IRMS où les isotopes sont ionisés puis séparés dans un champ magnétique. Les isotopes sont détectés séparément et le niveau de  $^{15}\text{N}$  est déterminé suivant leur ratio. La calibration du système se fait en utilisant des standards dont on connaît à la fois la quantité d'azote total (pourcentage d'azote, noté % N) et la quantité de  $^{15}\text{N}$ , ici l'atropine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Le spectromètre de masse permet



une mesure relative de l'abondance isotopique de l'échantillon étudié par rapport à un échantillon étalon. On utilise alors une unité relative d'expression de la composition isotopique, notée  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) et correspondant à la variation  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ . La précision de la mesure est de  $\pm 0.1$  ‰.

L'appareillage se constitue d'un spectromètre de masse Optima (Micromass, Villeurbanne, France) couplé à un analyseur élémentaire Flash-EA (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Ces analyses ont été réalisées par Marlène Lamothe (PMM, Orsay, France). Les échantillons solides de feuilles ou racines sont pesés de manière à obtenir suffisamment de matière détectable par l'IRMS, c'est-à-dire environ 2 mg. Ces valeurs à peser sont déterminées suivant le % N dans l'échantillon par référence à un standard utilisé pour calibrer l'appareil, ici l'atropine. Cette dernière est calibrée par rapport à l'acide glutamique certifié IAEA (International Atomic Energy Agency). Les échantillons sont disposés individuellement dans des nacelles en étain souples qui sont ensuite délicatement pliées et introduites dans le passeur automatique de l'EA. Chaque échantillon passe individuellement à travers le tube de combustion de l'analyseur et les gouttes d'étain restent emprisonnées dans une allonge située à l'extrémité supérieure du tube. Tous les trois échantillons, un passage de standards est couplé afin de corriger d'éventuelles dérives du signal isotopique au cours de l'analyse. Les paramètres de la source sont fixés avec une intensité d'ionisation de 600  $\mu\text{A}$  et une pression interne de  $4.5 \cdot 10^{-6}$  mbars dans la chambre d'ionisation.





## XII. Approches physiologiques

---

### A. Test de résistance à la bactérie *Pst*

---

#### 1. Inoculation des souches bactériennes virulente et avirulente

---

Les inoculations avec les souches virulente (*Pst DC3000*) et avirulente (*Pst-AvrRpm1*) de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ont été réalisées sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 5 à 6 semaines (stade rosette) cultivées en chambre de culture *Jours Courts* (photopériode de 8 h de lumière, sous intensité lumineuse de 200  $\mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Un jour avant l'inoculation, les plantes sont placées sous humidité saturante à l'aide d'une miniserre de sorte que les stomates soient bien ouverts le jour de l'infiltration des agents pathogènes. L'inoculation est réalisée en milieu de matinée, à l'aide d'une seringue de 1 mL sans aiguille en infiltrant la face abaxiale des feuilles avec une suspension bactérienne à  $10^5 \text{ cfu.mL}^{-1}$ . Les feuilles inoculées sont repérées avec un trait fin de feutre sur leur pétiole. Environ 6 plantes sont inoculées sur 3 à 5 feuilles. Des plantes témoins sont infiltrées en parallèle avec une solution de  $\text{MgCl}_2$  à 10 mM stérile (mock). Les plantes sont ensuite replacées sous humidité saturante dans des miniserres en chambre de culture *Jours Courts* jusqu'à l'échantillonnage.

Un contrôle de la croissance des bactéries est réalisé par étalement de 100  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne à  $10^3 \text{ cfu.mL}^{-1}$  sur milieu LB solide avec rifampicine (à  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et kanamycine (à  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Deux à trois jours après étalement, le nombre de colonies est compté afin de s'assurer que les bactéries infiltrées sont aptes à se développer.

#### 2. Échantillonnage

---

L'échantillonnage est réalisé pour chaque condition : chaque génotype, chaque traitement, chaque temps de la cinétique d'infection. De 0 à 72 hpi (heures post-inoculation), des disques foliaires de  $0.5 \text{ cm}^2$  sont collectés toutes les 24 h sur les feuilles



inoculées à l'aide d'un emporte pièce stérilisé entre chaque échantillon. Pour chaque point de temps de la cinétique d'infection, entre 4 et 6 échantillons sont constitués en poolant deux disques foliaires de différentes plantes traitées dans les mêmes conditions. Ces deux disques constituent un échantillon et sont placés dans des tubes contenant une bille en métal stérile et 400  $\mu\text{L}$  d'eau stérile. L'ensemble est broyé au broyeur à billes (1 minute à 20 Hz). Des dilutions sériées du broyat sont réalisées de dix en dix. Chaque dilution est ensuite étalée indépendamment six fois à raison de 10  $\mu\text{L}$  sur du milieu LB agar supplémenté en rifampicine et kanamycine (50 et 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivement). Après incubation 48 h à 30 °C, les colonies sont dénombrées à la dilution appropriée (Katagiri *et al.*, 2002).

### B. Analyse de la mort cellulaire

---

#### 1. Coloration des cellules mortes au bleu de trypan

---

Le bleu de trypan est un colorant azoïque qui est exclu des cellules vivantes, permettant ainsi de colorer spécifiquement les cellules ou tissus morts. En effet, ce composé pénètre dans les cellules et entraîne un mécanisme d'exclusion nécessitant de l'énergie (ATP) et donc des cellules viables. Son accumulation s'accompagne de la formation d'un précipité bleu permettant de localiser les zones de mort cellulaire sur les feuilles (Wäspi *et al.*, 2001). Les feuilles sont incubées une nuit à 37 °C dans une solution de bleu de trypan (10 g de phénol, 10 mg de bleu trypan, 10 mL d'acide lactique, 10 mL de glycérol et 10 mL d'eau bidistillée). Puis elles sont décolorées par 3 bains successifs de 24 h dans une solution de chloral hydrate à 15 M (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) chauffée à 60 °C pendant une heure pour accélérer la décoloration. Les feuilles sont montées entre lame et lamelle puis observées et photographiées sous une loupe binoculaire et un microscope. L'intensité de la coloration peut également être quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).



## 2. Mesure conductimétrique de la fuite d'électrolytes

---

L'estimation de la fuite d'électrolytes se fait par mesure de la conductivité à l'aide d'un conductimètre CDM210 (Radiometer analytical, Villeurbanne, France) selon le protocole de Pike *et al.* (1998). Six disques foliaires (1.2 cm<sup>2</sup> au total) sont prélevés sur 4 plantes différentes et poolés dans des piluliers contenant 2 mL d'eau stérile à température ambiante. Une incubation sous agitation continue est réalisée pendant 2 h à température ambiante et une première lecture de la conductimétrie est réalisée. Une deuxième lecture est effectuée sur les mêmes échantillons préalablement bouillis pendant 15 minutes. L'ébullition détruit les cellules qui vont alors déverser leur contenu total en électrolytes. Cette deuxième série de lecture correspond à 100 % de fuite d'électrolytes.

### C. Mesures des échanges gazeux

---

L'analyse des échanges gazeux donne accès à certaines mesures physiologiques comme les paramètres photosynthétiques et respiratoires. Nous avons utilisé un système dit ouvert, adapté à la taille des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Il permet le renouvellement perpétuel de l'air disponible au niveau de la feuille. L'appareillage est constitué d'un appareil LI-COR 6400 XT (LI-COR®, Lincoln, USA) possédant deux analyseurs IRGA (Infra Red Gaz Analyser) qui mesurent en permanence la fraction molaire en CO<sub>2</sub> dans le canal de référence (air entrant) et le canal de mesure (air sortant) de la chambre de mesure. Celle-ci est composée d'une pince hermétique clipable. Cet appareillage est complété par un système de décarboxylation de l'air à l'aide de chaux sodée présent sur le LI-COR et d'un régulateur d'humidité *dew point generator* Li-610 (LI-COR®, Lincoln, USA).

La procédure expérimentale consiste à piéger à l'obscurité une feuille intacte dans la chambre refermée hermétiquement à l'aide de térostat (Teroson, Suresnes, France). L'air est tout d'abord entièrement décarboxylé par de la chaux sodée, jusqu'à stabilisation du signal enregistré par l'analyseur IRGA (environ 30 minutes). La chaux sodée est ensuite court-circuitée et un gaz de concentration en CO<sub>2</sub> connue est appliqué à la feuille (fraction molaire



en CO<sub>2</sub> de 400 μmol.mol<sup>-1</sup> (ppm) et 21 % d'O<sub>2</sub>). La source lumineuse (LED bleues et rouges) est ensuite allumée (300 μmoles de photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) puis après 15 minutes de stabilisation, les mesures de photosynthèse sont effectuées sous une température foliaire de 25 °C et une humidité de 60 %. L'entrée de vapeur d'eau est monitorée par le *dew point generator* Li-610. Après deux heures d'éclairement, la source lumineuse est éteinte et les mesures de respiration à l'obscurité sont effectuées. La mesure des échanges gazeux peut être effectuée en faisant varier différents paramètres expérimentaux (fraction molaire en CO<sub>2</sub>, intensité lumineuse, température foliaire, etc.). Deux courbes de mesures ont été établies : la courbe A(PAR), c'est-à-dire la photosynthèse nette (A) en fonction de l'intensité lumineuse (*Photosynthetic Active Radiation*, PAR) et la courbe A(Ci), qui représente A en fonction de la fraction molaire en CO<sub>2</sub> (Ci). La quantité de gaz échangée entre la feuille et l'air est mesurée en comparant la concentration en CO<sub>2</sub> pré- et post-opératoire.

L'assimilation photosynthétique nette (A) est calculée selon le bilan de masse suivant :

$$A = [(CO_2R - CO_2S)/V.S].D$$

où CO<sub>2</sub>R est la fraction molaire en CO<sub>2</sub> dans le canal de référence entrant (c'est à dire l'air entrant), CO<sub>2</sub>S la fraction molaire en CO<sub>2</sub> du canal de référence sortant (air sortant), V le volume molaire (L.mol<sup>-1</sup>) de l'air à température et pression considérées, S (m<sup>2</sup>) la surface de la feuille et D (L.s<sup>-1</sup>) le débit de l'air entrant dans la chambre.

### XIII. *Analyses in silico*

---

L'avènement de l'outil bioinformatique permet une souplesse et une efficacité surprenante dans le traitement des données. Différents sites internet ou programmes informatiques ont été utilisés durant ce travail de thèse.





### A. Les sites de bases de données génomiques et protéomiques

---

Différents sites de bases de données génomiques, d'outils de cartographie, de catalogues de banque de mutants ont été consultés pendant la réalisation de ce travail de thèse. Le site des ressources d'informations sur *Arabidopsis* (TAIR) dispose d'une base de données de génétique et de biologie moléculaire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ([http://www.arabidopsis\\_thaliana.org/](http://www.arabidopsis_thaliana.org/)). Un site équivalent munichois de ressources génomiques dédiées à *Arabidopsis thaliana* est également disponible à l'adresse <http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/athal/> (Munich Information Center for Protein Sequence, MIPS). Le site T-DNA express du Salk Institute Genomic Analysis Laboratory permet de visualiser la position des gènes, des insertions ADN-T et des ADNc disponibles auprès de la communauté scientifique (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Un autre site de bases de données intégratives sur le génome d'*Arabidopsis thaliana* est disponible en France sur le site internet <http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/index.shtml>. Les catalogues de ressources génétiques qui permettent en particulier de commander des lignées mutantes d'*Arabidopsis thaliana* sont disponibles sur le site du *European Arabidopsis Stock Center* (NASC, [http://arabidopsis\\_thaliana.info/](http://arabidopsis_thaliana.info/)) et du *Arabidopsis Biological Resource Center* aux Etats-Unis (ABRC, <http://abrc.osu.edu/>).

### B. Genevestigator

---

Le site internet Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) fournit des profils d'expression d'après des bases de données d'expression génique, pour des gènes d'intérêt chez plusieurs espèces, notamment en fonction des différents organes, du stade de développement, en réponse à des stimuli ou chez des mutants (Zimmermann *et al.*, 2004).



### C. MapMan®

---

MapMan® est un logiciel d'analyse de groupes de données importantes comme celles issues d'études transcriptomiques ou métabolomiques (Thimm *et al.*, 2004). Il permet notamment la création de diagrammes de voies métaboliques, de diagrammes de Venn, etc. Le logiciel est disponible sur le site <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>.

### D. MeV

---

La force d'un logiciel comme MeV (Multiexperiment Viewer) réside dans son interface souple couplée à un large choix d'outils statistiques (classification hiérarchique, analyse en composantes principales, carte de chaleur, etc.). Des données diverses et variées peuvent être analysées par MeV (microarray, profilages métaboliques, polymorphismes, exons, etc.). Ce logiciel est téléchargeable à l'adresse <http://www.tm4.org/mev/>.

### E. Brenda

---

Le site Brenda (<http://www.brenda-enzymes.org/>) constitue une riche base de données utile aux études enzymologiques. Il référence les paramètres cinétiques d'un grand nombre d'enzymes, pour plusieurs organismes dont certaines espèces végétales.



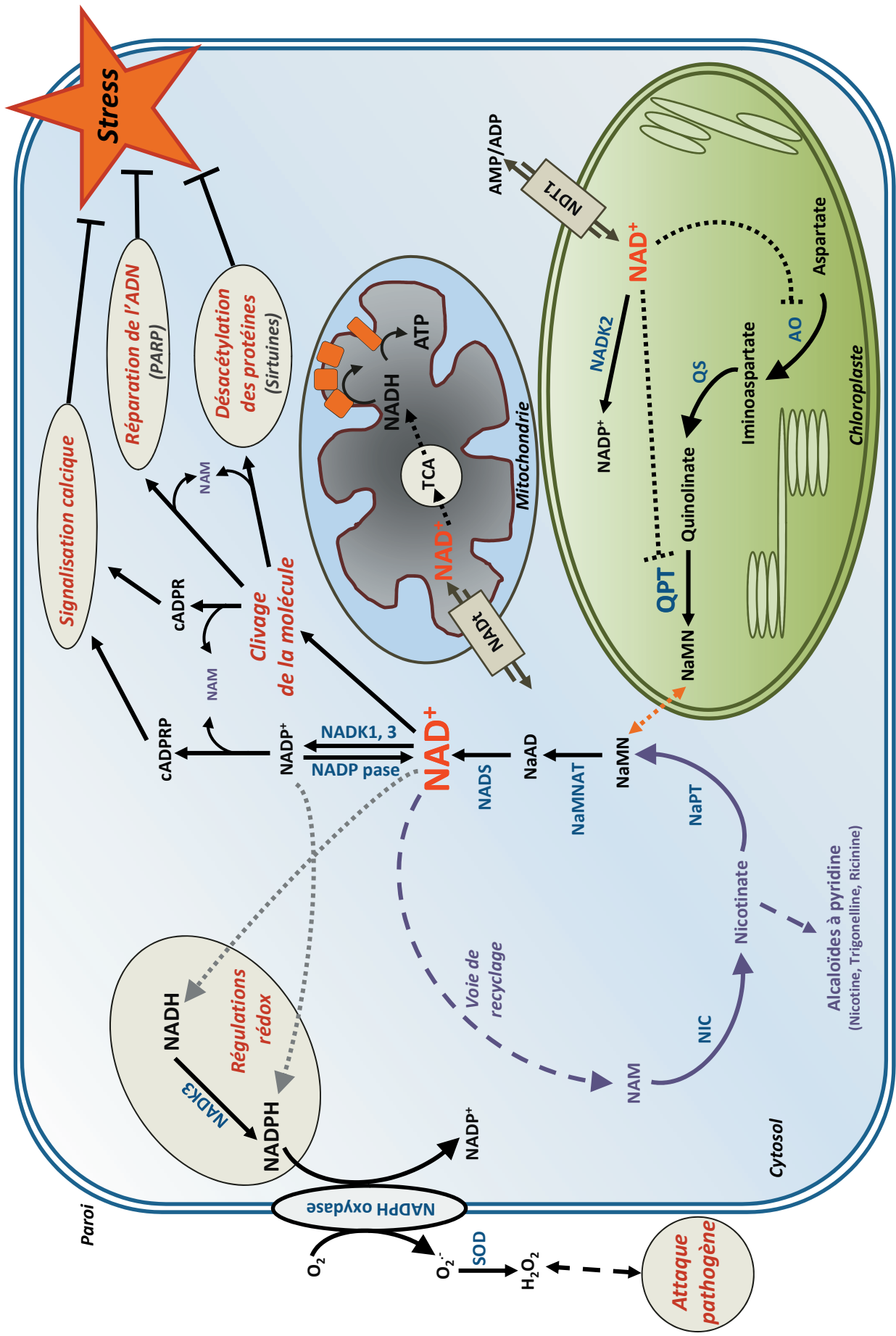
# Résultats



## CHAPITRE I

**Obtention d'un système inductible de surproduction *in planta*  
de NAD chez *Arabidopsis thaliana***





**Figure 47. Métabolisme du NAD chez *Arabidopsis thaliana*.** Biosynthèse *de novo*, recyclage, catabolisme et utilisation de la molécule de NAD<sup>+</sup>. Les flèches pleines représentent des réactions montrées expérimentalement. En pointillés figurent plusieurs étapes réactionnelles condensées ou des réactions non démontrées. La flèche orange correspond à un transport potentiel du NaMN hors du chloroplaste. Les flèches terminées par une barre indiquent un rétrocontrôle négatif. NADPase : NADP phosphatase. NADt et NDT1 : transporteur NAD<sup>+</sup> ; TCA : cycle de Krebs. Pour les autres abréviations, voir le texte de l'introduction.

## I. Obtention d'un système inductible de surproduction *in planta* de NAD chez *Arabidopsis thaliana*

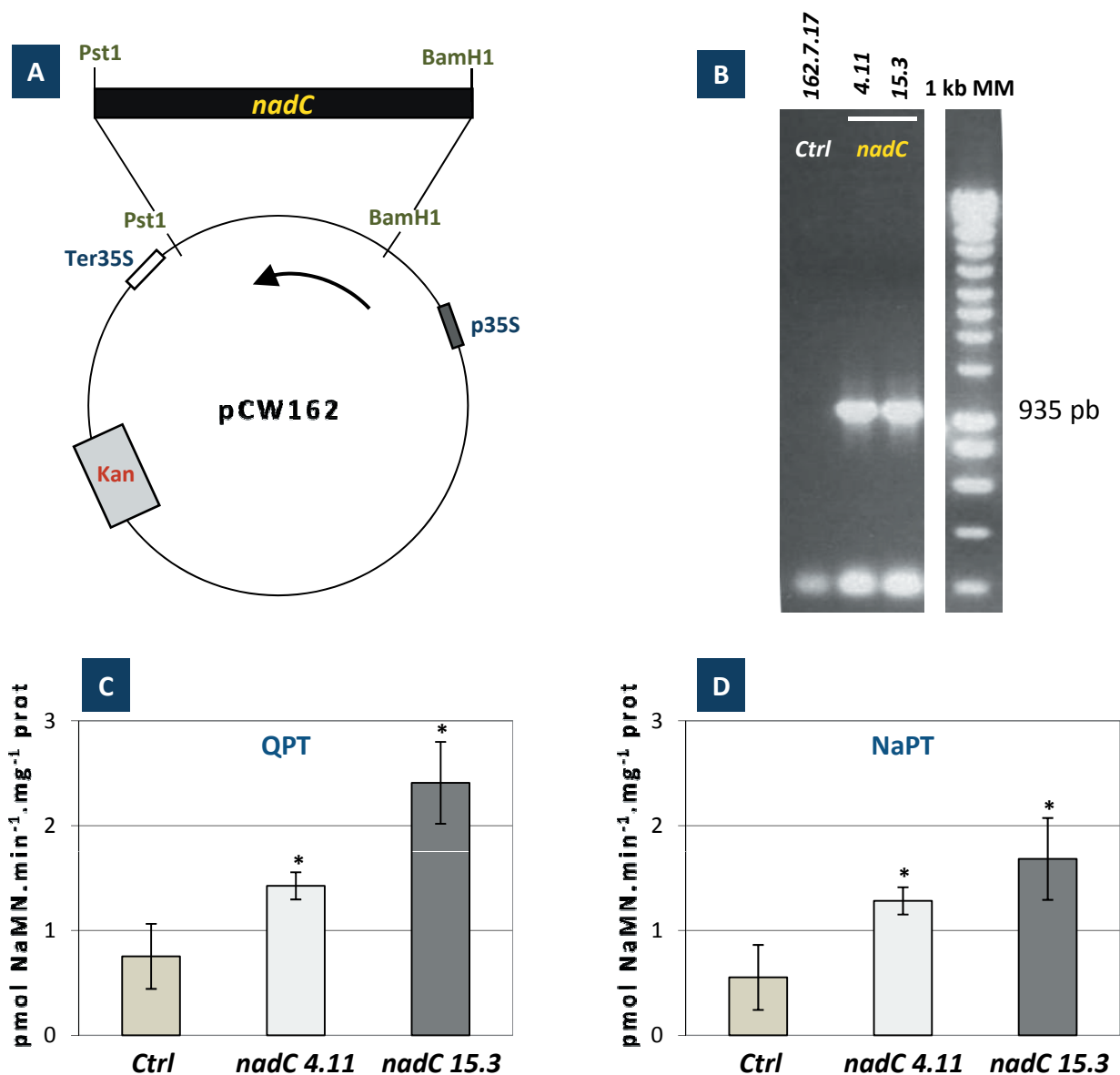
---

### A. But de l'étude : surexpression du gène *nadC* d'*Escherichia coli* chez *Arabidopsis thaliana*

---

Compte tenu de l'importance que revêt la quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT) dans la production du NAD et de ses dérivés chez le tabac (**Figure 47**) (Saunders et Bush, 1979 ; Sinclair *et al.*, 2000), le laboratoire a entrepris de surproduire cette enzyme chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, et ce afin d'augmenter le pool de nucléotides à pyridine et tester les conséquences transcriptomiques, métaboliques et physiologiques. Cette enzyme est codée par le gène *nadC* chez l'entérobactérie *Escherichia coli* (Griffith *et al.*, 1975). L'intérêt de surproduire l'homologue bactérien de la QPT chez *Arabidopsis thaliana* réside dans la possible absence de régulation transcriptionnelle et surtout biochimique de l'enzyme chez le végétal.

La stratégie retenue a consisté à surexprimer le gène *nadC* dans le cytosol. L'expression ectopique de ce gène dans le cytoplasme permettrait notamment de s'affranchir de possibles régulations intrinsèques au compartiment naturel d'adressage du gène QPT de plantes, le chloroplaste (Kato *et al.*, 2006). Pour cela, nous avons utilisé le plasmide pCW162, cordialement fourni par Marie-Pascale Doutriaux (Institut de Biologie des Plantes, Orsay, France). La construction utilisée est schématisée sur la **Figure 48 A**. Sous le contrôle du promoteur 35S CaMV, issu du virus de la mosaïque du chou-fleur, l'expression est forte et constitutive. Le plasmide pCW162 confère également aux transformants une résistance à l'antibiotique kanamycine. Nous avons utilisé comme contrôle une lignée sauvage d'écotype Columbia (Col0) chez laquelle a été insérée une construction de type vecteur vide. Cette lignée contrôle est notée *Ctrl*. L'obtention des plantes transgéniques surexpresses a été réalisée par Bertrand Gakière et Jutta Hager au laboratoire.



**Figure 48. Surexpression chez *Arabidopsis thaliana* du gène *nadC* codant la QPT d'*Escherichia coli* : caractérisation moléculaire et mesure d'activités phosphoribosyltransférases.** A : construction utilisée pour l'obtention des plantes transgéniques *nadC*. La séquence codante du gène *nadC* a été clonée entre les sites de restriction BamH1 et Pst1, eux mêmes placés entre le promoteur (p35S) et le terminateur (Ter35S) du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) présents dans le vecteur binaire pCW162. Les transformants sont résistants à la kanamycine (Kan). B : analyse de la présence du gène *nadC* par technique d'amplification par PCR. L'ADN génomique a été extrait des plantes *Ctrl*, *nadC 4.11* et *15.3*. L'amplification d'un fragment de taille attendue (935 pb) est observée chez les deux lignées *nadC* (pour les amorces, voir Matériels et Méthodes). C et D : dosage des activités QPT et NaPT. Les mesures correspondent à la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants,  $\pm$  Erreur Standard (SE) de trois mesures. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au contrôle correspondant (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student).

## B. Caractérisation moléculaire des lignées *nadC*

---

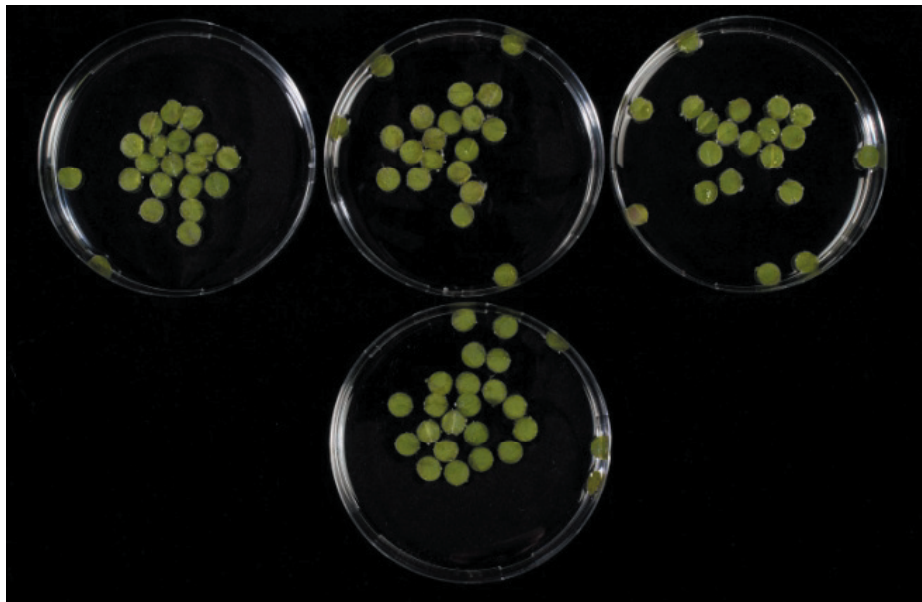
Les transformants résistants à la kanamycine ont été sélectionnés sur cinq générations. Plusieurs lignées stables ont été obtenues parmi lesquelles les lignées 4.11 et 15.3 sur lesquelles se concentrent nos analyses car elles surexprimaient le plus le gène *nadC* (Bertrand Gakière et Jutta Hager, communication personnelle). Une amplification PCR utilisant des amorces spécifiques au gène bactérien *nadC* montre que les lignées 4.11 et 15.3 présentent effectivement un fragment d'amplification de 935 pb à la taille attendue (**Figure 48 B**). La lignée *Ctrl* ne présente pas cet amplicon.

## C. Mesures d'activités phosphoribosyltransférases (PRTases) sur les lignées *nadC*

---

En présence de  $MgCl_2$ , la QPT catalyse la conversion du quinolinate en NaMN (**Figure 47**). Le développement d'une méthode de chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour quantifier le NaMN nous a permis de mesurer l'activité spécifique extractible de la QPT. Les dosages obtenus (**Figure 48 C**) montrent une augmentation substantielle de l'activité QPT chez les lignées *nadC* par rapport au *Ctrl*. Cette augmentation est modérée chez la lignée 4.11 et conséquente chez les plantes 15.3.

Le NaMN peut également être formé par l'activité des acide nicotinique phosphoribosyltransférases (NaPT) (**Figure 47**). La méthode de quantification du NaMN par HPLC a également servi au dosage de l'activité maximale extractible NaPT. La **Figure 48 C** indique une augmentation de cette activité chez les deux lignées *nadC* par rapport aux plantes *Ctrl*.



**Figure 49. Incubation des disques foliaires en présence de quinolinate.** Les disques foliaires des lignées *Ctrl* et *nadC 4.11* et *15.3* (ici non distinguées) sont mis à incuber pendant 48 h dans un tampon MOPS (acide 3-N-morpholino propanesulfonique) 50 mM pH 6 additionné ou non de quinolinate (100  $\mu$ M).

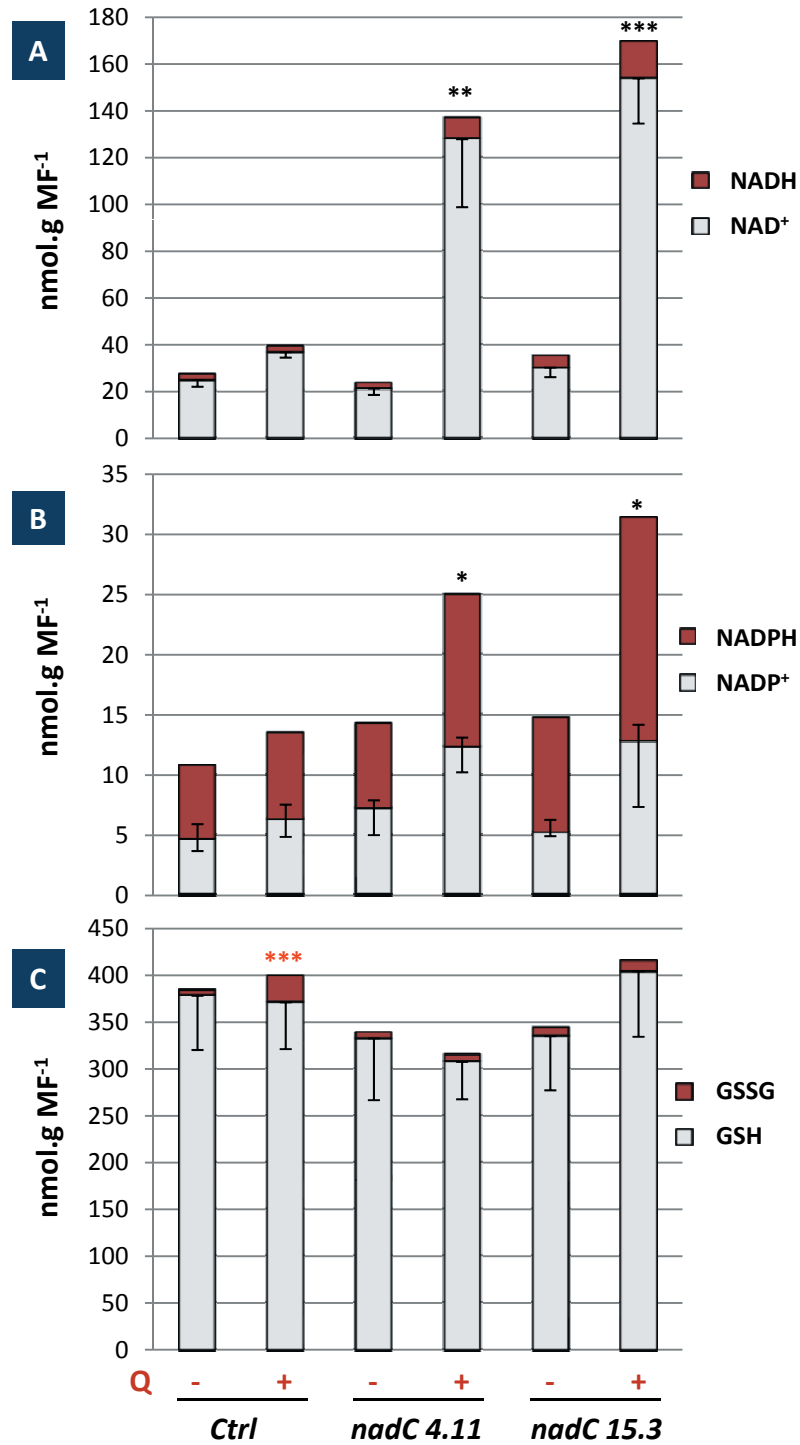
D. Un système inductible de surproduction du NAD chez *Arabidopsis thaliana*

---

L'objectif de ces travaux était d'augmenter les teneurs en NAD chez les plantes, afin d'étudier consécutivement à cette accumulation les réponses du végétal à différents niveaux d'intégration biologique : expression des gènes, profilage des métabolites, tests physiologiques.

Après obtention des lignées transgéniques *nadC* surproduisant la QPT, un système inductible a été développé. Pour cela une méthode d'incubation de disques foliaires a été adoptée. Cette technique permet de calibrer la surface foliaire étudiée tout en permettant d'éventuels traitements avec des molécules exogènes. En particulier, afin d'accroître les niveaux de NAD, l'incubation doit être réalisée en présence de quinolinate, substrat de la QPT (**Figure 47**). Des disques foliaires des lignées *Ctrl* et *nadC* sont mis à incuber pendant 48 h à l'obscurité dans un tampon adéquat (acide 3-N-morpholino propanesulfonique, MOPS) supplémenté ou non en quinolinate (**Figure 49**). L'incubation est réalisée pendant 48 h à l'obscurité afin d'éviter la production d'anthocyane lorsque les disques sont traités au quinolinate à la lumière.

Une quantification des pools libres extractibles d'antioxydants cellulaires a été réalisée selon une méthode spectrophotométrique modifiée de [Queval et Noctor \(2007\)](#). Cette technique permet de quantifier de façon fine de nombreux nucléotides à pyridine et autres composés rédox comme le glutathion et l'ascorbate. L'analyse du pool d'antioxydants s'est complétée par un dosage de composés thiolés *via* une méthode HPLC par détection fluorimétrique après dérivatisation au monobromobimane (mBBBr). D'après la **Figure 50 A**, les dosages obtenus montrent très nettement que les lignées *nadC* traitées au quinolinate accumulent de 3 à 4 fois plus de NAD par rapport au *Ctrl*. En revanche, l'état redox du NAD n'est pas affecté de façon significative, puisque le ratio  $NAD^+/NADH$  reste proche de 9 % pour les différentes conditions. La lignée *nadC 15.3* accumule plus de NAD que la lignée *4.11*, ce qui laisse penser des conséquences métaboliques plus importantes pour cette lignée, en vertu du rôle majeur du NAD dans le métabolisme rédox. Une hausse des teneurs en NADP(H) est aussi observée pour le chez les lignées qui surexpriment le gène *nadC*



**Figure 50. Mesures des pools d'antioxydants libres cellulaires.** A : dosage des teneurs en NAD(H). B : mesure des niveaux de NADP(H). C : dosage des pools de glutathion réducté (GSH) et oxydé (GSSG). Les histogrammes représentent la moyenne de cinq réplicats biologiques indépendants,  $\pm$  SE de cinq mesures. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au contrôle correspondant (A et B : Ctrl+Q ; C : Ctrl) (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.005, test t de Student). Q : quinolinate.

(**Figure 50 B**). Notons que le traitement au quinolinate chez le *Ctrl* provoque une très faible augmentation du NAD.

En ce qui concerne le glutathion, l'ascorbate et certains thiols (cystéine, homocystéine, cystéine-glycine ou  $\gamma$ -glutamyl-cystéine), les dosages obtenus n'indiquent pas de modifications majeures pour l'ensemble des antioxydants testés (**Figures 50 C et 51**). En revanche, pour le glutathion, même si le pool total (réduit, GSH + oxydé, GSSG) ne varie pas pour les différentes conditions, il est à noter une augmentation du rapport GSSG/GSH chez le *Ctrl* traité au quinolinate (**Figure 50 C**). L'état rédox du glutathion est en effet perturbé en faveur d'une oxydation de ce composé. Il semblerait ainsi que le traitement au quinolinate entraîne un milieu cellulaire plus oxydant chez le *Ctrl*. Pour les lignées qui surexpriment le gène *nadC*, ce phénomène n'est pas retrouvé. Le quinolinate semble bien métabolisé par la QPT d'*Escherichia coli*. Le temps d'incubation a été optimisé à 48 h de façon à obtenir la production en NAD la plus importante.

## E. Conclusion et discussion

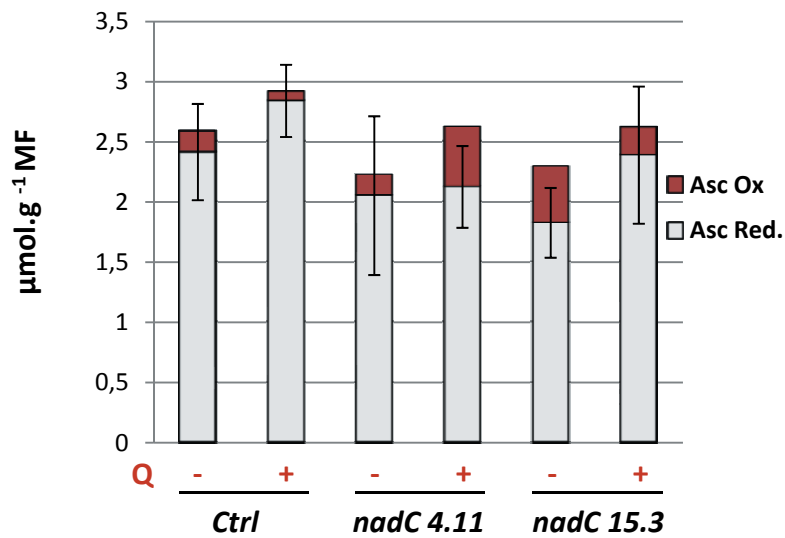
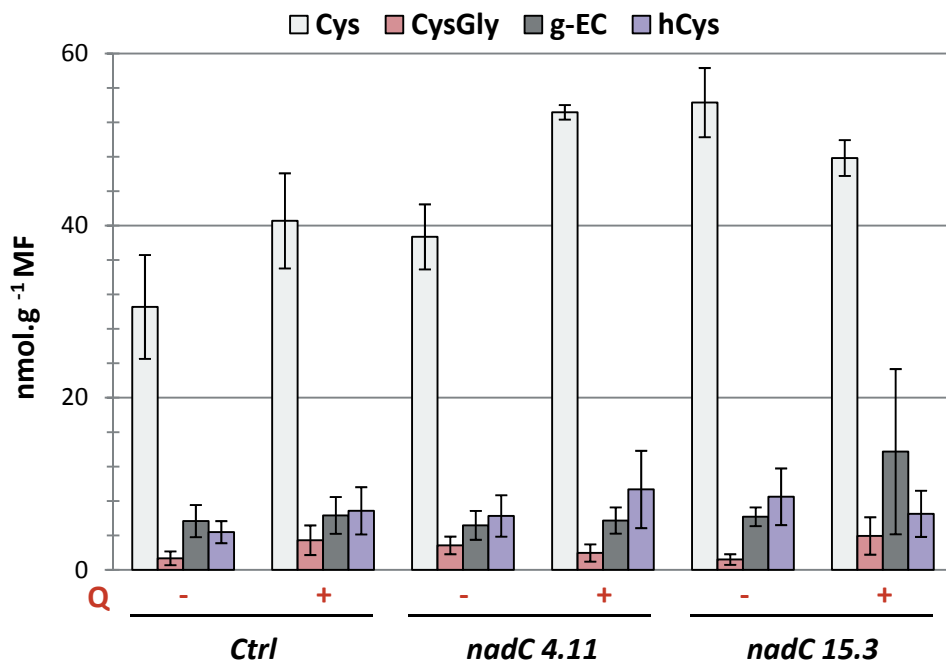
---

### 1. La surproduction de QPT bactérienne permet chez les plantes d'augmenter les teneurs en NAD en présence de quinolinate

---

La stratégie de surexpression du gène bactérien *nadC* chez *Arabidopsis thaliana* s'est traduite par un succès. Pour la première fois chez les plantes, de façon inductible et sans modifier l'état rédox des nucléotides à pyridine, la manipulation de la biosynthèse du NAD aboutit à une augmentation jusqu'à 4 fois du pool stationnaire de NAD. Les difficultés techniques de manipulation de la synthèse du NAD ont été surmontées par l'utilisation de plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant le gène *nadC* codant la QPT. Ces résultats soulignent la place majeure qu'exerce cette enzyme de biosynthèse dans la production du NAD chez les plantes, comme suggérée chez le tabac (voir Introduction).



**A****B**

**Figure 51. Mesures de l'ascorbate et d'autres composés thiolés.** A : dosage des pools réduits (barres grises) et oxydés (barres rouges) d'ascorbate. B : mesure de composés thiolés outre le glutathion. Cys : cystéine ; CysGly : cystéine-glycine ; g-EC :  $\gamma$ -glutamyl-cystéine ; hCys : homocystéine. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de quatre réplicats biologiques indépendants,  $\pm$  SE de quatre mesures.

En revanche, l'augmentation en NAD nécessite la fourniture en quinolinate exogène. L'acide quinolinique produit dans le chloroplaste (**Figure 47**) est naturellement métabolisé par la QPT de plante, également chloroplastique (Katoh *et al.*, 2006). Par ailleurs, on pourrait penser que le quinolinate serait "piégé" dans ce compartiment subcellulaire faute de transporteurs permettant son export vers le cytoplasme. Dans le cadre du système de surexpression du gène *nadC*, ceci empêcherait la QPT bactérienne surproduite dans le cytosol d'avoir accès à son substrat, d'où l'apport nécessaire de quinolinate exogène pour accroître les teneurs en NAD.

Il est intéressant de souligner une augmentation des activités des phosphoribosyltransférases (QPT et NaPT) simultanées chez les plantes *nadC*. L'augmentation des niveaux de NaPT peut refléter une activation du recyclage sous l'effet de l'élévation des teneurs en NAD néo-synthétisées. Cette observation est à mettre en parallèle avec l'étude du mutant de QS *old5* qui présente des niveaux de NAD légèrement augmentés et associés à une induction des enzymes du recyclage (Schippers *et al.*, 2008).

## 2. Le quinolinate non métabolisé conduit à un milieu cellulaire plus oxydant

---

Le traitement au quinolinate chez le *Ctrl* entraîne une modification de l'état rédox du glutathion, soulignant ainsi un stress oxydant dans la cellule. Le glutathion constitue l'un des composés clé dans le maintien de la balance rédox cellulaire (pour revue Foyer et Noctor, 2011). Son état de réduction est généralement proche de 90 % dans les cellules végétales. La toxicité de molécules exogènes peut se traduire par un stress oxydant, entraînant de surcroît une oxydation du pool stationnaire de glutathion. C'est ce qui est observé chez les disques *Ctrl* incubés dans le quinolinate. Ce stress n'en demeure pas moins modeste puisque les modifications des teneurs en GSH et GSSG ne sont pas drastiques.



## CHAPITRE II

### **Conséquences métaboliques d'une augmentation inductible de NAD chez *Arabidopsis thaliana***



## II. Conséquences métaboliques d'une augmentation inductible de NAD chez *Arabidopsis thaliana*

---

### A. La métabolomique ou l'étude du métabolome

---

La métabolomique correspond à l'identification et la quantification (absolue ou relative par rapport à un standard) d'une partie ou de l'ensemble des métabolites (sucres, acides aminés, acides gras, composés secondaires, etc.) présents dans un système biologique (du compartiment subcellulaire jusqu'à l'organisme entier). Le terme anglo-saxon métabolome a été proposé en 1998 par *Oliver et al.*, par analogie avec les termes génome, protéome et transcriptome. A l'instar de ces autres approches dites "omiques", le métabolome est dynamique et se verra modifié en fonction du temps et de l'espace d'étude.

Les métabolites peuvent revêtir une grande diversité physico-chimique ce qui rend l'accès à la totalité des composés technologiquement impossible en une seule méthode d'analyse (extraction et quantification). Deux approches métabolomiques se distinguent généralement. L'une est dite *ciblée* car elle oriente l'analyse vers un certain nombre de métabolites souvent bien connus, associés par exemple à une voie métabolique particulière (c'est notamment le cas des acides aminés ou des sucres). Les échantillons sont généralement pré-concentrés ou purifiés après extraction et analysés par des méthodes de chromatographie liquide (LC) ou en phase gazeuse (GC), suivies d'une détection en UV, en fluorescence ou par spectrométrie de masse (MS). La seconde approche est appelée *profilage métabolique* et consiste à analyser une classe de métabolites présentant des propriétés physico-chimiques proches, ou du moins qui peuvent répondre similairement à une dérivatisation chimique. Cette technique repose sur l'utilisation de méthodes de séparation chromatographique (LC ou GC), couplée à la MS en général, voire à une détection en UV ou par fluorimétrie.



A l'égal d'autres approches "omiques", la métabolomique est une science générant un grand nombre de données qu'il convient d'analyser par des outils bioinformatiques adéquats. Ces outils très bien développés pour les approches génomiques ou transcriptomiques le sont moins pour le traitement des données issues de la métabolomique. Des logiciels comme MeV (Multiexperiment Viewer) permettent néanmoins de réaliser des comparaisons de profils de métabolites, de traiter les données par analyses en composantes principales (PCA) ou d'effectuer une classification hiérarchique afin de déterminer quels sont les métabolites ou classes de métabolites qui varient de façon similaire selon les conditions.

### B. Approches métabolomiques retenues dans cette étude

---

Le NAD joue un rôle critique dans l'activité de très nombreuses oxydoréductases, intervenant ainsi dans virtuellement tous les métabolismes. De ce fait, il était pertinent d'évaluer à plus grande échelle quelles étaient les répercussions d'une accumulation stationnaire de NAD sur le pool de métabolites. Afin d'appréhender cette problématique, l'étude des disques foliaires *nadC* s'est poursuivie par une approche métabolomique en utilisant deux techniques. D'une part, une quantification absolue des acides aminés a été effectuée par une technique HPLC avec détection en fluorescence après dérivation chimique. D'autre part, une méthode GCMS a permis de mesurer les niveaux relatifs d'un grand nombre d'intermédiaires métaboliques comme les acides organiques, les sucres, les acides gras, etc. (Bathellier *et al.*, 2009 ; Tcherkez *et al.*, 2010).



	<i>Ctrl</i>	±	<i>Ctrl</i> <b>+ Q</b>	±	<i>nadC</i> <b>4.11</b>	±	<i>nadC</i> <b>4.11</b> <b>+ Q</b>	±	<i>nadC</i> <b>15.3</b>	±	<i>nadC</i> <b>15.3</b> <b>+ Q</b>	±
<b>Total</b> ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MF)	23	0,7	20	1,2	24	1,0	20	1,2	19	0,9	24	1,0
<b>Acides aminés</b> ( $\text{nmol.g}^{-1}$ MF)												
<b>Ala</b>	1251	16	1228	164	1132	73	903	109	832	93	1057	112
<b>Asn</b>	3342	138	2187	188	2541	15	2846	121	3073	29	3433	53
<b>Asp</b>	1553	1	1199	2	1136	36	1155	121	1039	37	1257	16
<b>b-Ala</b>	204	14	213	5	194	4	167	22	168	9	172	8
<b>g-ABA</b>	110	5	89	7	110	16	102	5	87	2	103	5
<b>Gln</b>	5791	30	4194	14	5248	112	4893	350	4632	396	5196	0
<b>Glu</b>	2647	117	2057	42	2132	13	2465	0	2130	36	2662	87
<b>Gly</b>	708	23	518	32	564	8	713	36	759	44	1014	172
<b>His</b>	550	16	671	43	599	43	528	21	652	23	447	15
<b>Ile</b>	632	2	538	5	550	9	555	18	606	59	814	56
<b>Leu</b>	402	1	340	8	345	4	329	17	259	20	524	42
<b>Lys</b>	462	23	443	10	387	18	360	34	458	16	469	49
<b>Met</b>	31	5	25	1	27	2	41	0	35	1	50	6
<b>Orn</b>	156	4	163	5	141	1	153	0	202	6	220	14
<b>Phe</b>	302	15	218	0	241	8	279	11	249	41	436	12
<b>Ser</b>	2245	213	1690	249	1960	149	2260	258	1748	24	2624	292
<b>Thr</b>	1576	44	1355	5	1464	13	1550	52	1296	30	1787	3
<b>Trp</b>	189	6	261	66	147	29	171	13	168	5	155	2
<b>Val</b>	1083	16	912	3	935	4	986	14	1082	75	1488	93

**Figure (Tableau) 52. Mesures des pools libres d'acides aminés.** Les acides aminés ont été déterminés par technique HPLC (voir Matériels et Méthodes). Le pool total a été déterminé par addition des différents acides aminés détectés. Ala : alanine ; Asn : asparagine ; Asp : aspartate ; b-Ala : bêta alanine ; g-ABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique ; Gln : glutamine ; Glu : glutamate ; Gly : glycine ; His : histidine ; Ile : isoleucine ; Leu : leucine ; Lys : lysine ; Met : méthionine ; Orn : ornithine ; Phe : phénylalanine ; Ser : sérine ; Thr : thréonine ; Trp : tryptophane ; Val : valine. Les valeurs correspondent à la moyenne de triplicats biologiques indépendants,  $\pm$  SE de trois mesures (notée  $\pm$ ).

C. La surproduction de NAD est associée à une modification du métabolisme primaire cellulaire

---

1. Perturbation de la balance azotée : modification des pools d'aspartate et de ses dérivés

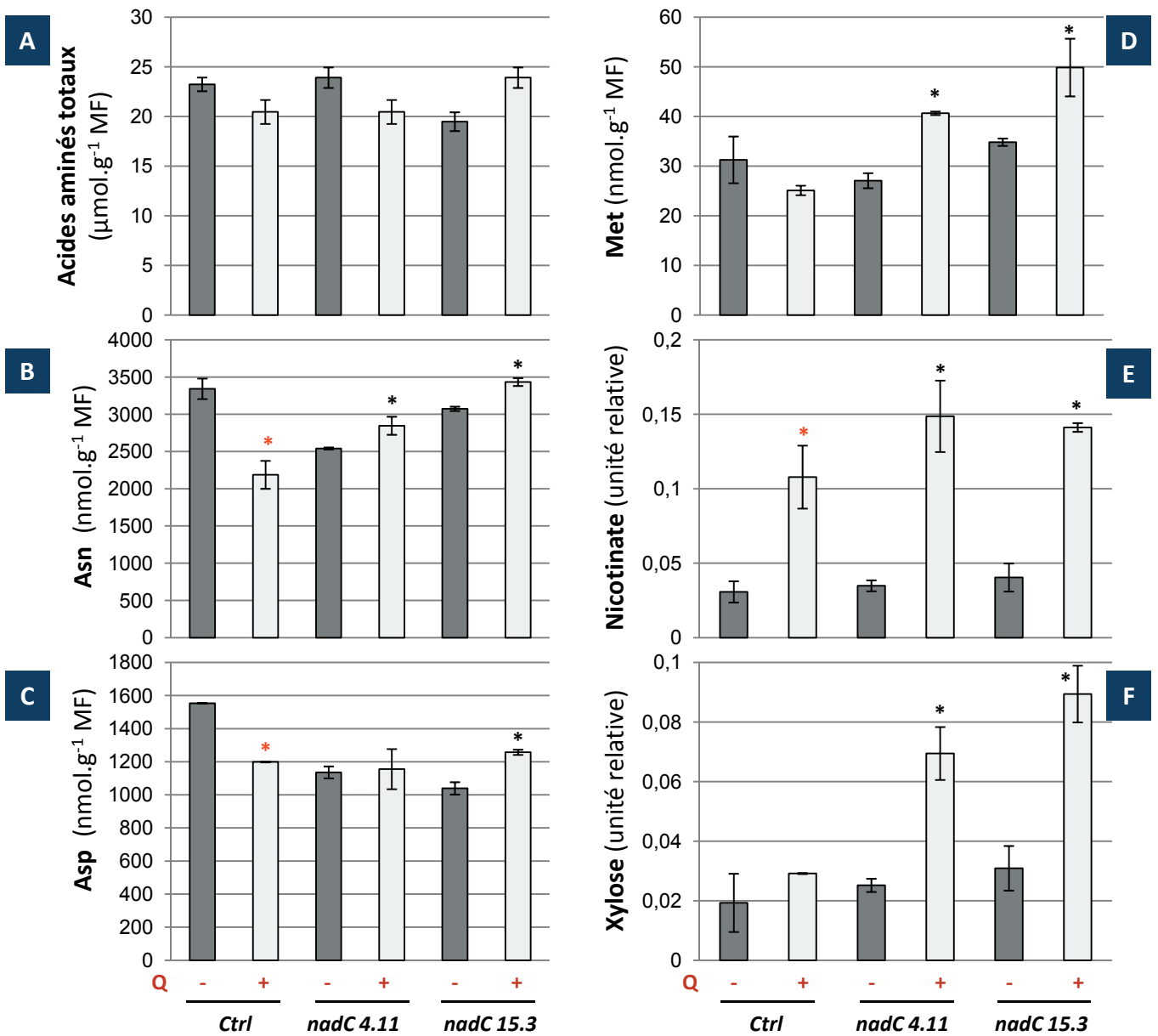
---

Les dosages obtenus par les techniques HPLC et GCMS indiquent une forte perturbation des pools d'acides aminés chez les lignées *nadC* accumulant du NAD (**Figure 52**). Bien que les teneurs totales en acides aminés ne varient pas pour les différentes conditions (**Figure 53 A**), l'enrichissement en NAD entraîne une accumulation d'aspartate (Asp) et de ses dérivés comme la méthionine (Met) (**Figures 53 C et D**), l'isoleucine (Ile), la leucine (Leu), la valine (Val) (**Figure 52**) et également l'asparagine (Asn), forme aminée de l'Asp (**Figure 53 B**). Ces augmentations sont observées chez les deux lignées *nadC* en présence de quinolinate (**Figures 52 et 53**). Dans les mêmes conditions (*nadC* traitées au quinolinate), des niveaux intermédiaires de sérine (Ser), phénylalanine (Phe), glutamine (Gln) et glutamate (Glu) sont également observés (**Figure 52**). Chez le *Ctrl*, le traitement au quinolinate engendre une baisse des niveaux d'Asn, d'Asp et de ses dérivés (**Figure 53**).

2. Un enrichissement en xylose est observé chez les lignées qui accumulent du NAD

---

Le profilage métabolique en GCMS indique également un enrichissement en xylose dans les disques foliaires *nadC* en présence de quinolinate (**Figure 53 F**). Ceci est vrai pour les deux lignées *nadC* 4.11 et 15.3 lorsqu'elles accumulent du NAD.



**Figure 53. Sélection des fluctuations de certains métabolites.** A : acides aminés totaux ; B : Asn, asparagine ; C : Asp, aspartate ; D : Met, méthionine ; E : nicotinate ; F : xylose. Les histogrammes A à D correspondent aux valeurs présentées dans la **Figure (Tableau) 52**. Les histogrammes E et F proviennent du profilage métabolique par technique GCMS. Ces derniers résultats (E et F) sont représentés en unité relative par rapport à la quantification d'un standard interne, ici le ribitol. Les valeurs correspondent à la moyenne de triplicats biologiques indépendants,  $\pm$  SE de trois mesures (notée  $\pm$ ). Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au contrôle correspondant (*Ctrl vs Ctrl+Q* et *Ctrl+Q vs nadC+Q*) (\* $P < 0.05$ , test *t* de Student).

### 3. L'apport de quinolinate induit une accumulation d'acide nicotinique

---

Une observation frappante de ces analyses métabolomiques est une très nette accumulation d'acide nicotinique au cours du traitement au quinolinate chez les différents disques *Ctrl* et *nadC* (**Figure 53 E**). Le nicotinate est un dérivé du NAD (**Figure 47**) et intervient dans la voie de recyclage des nucléotides à pyridine.

#### D. Discussion et conclusion

---

##### 1. Une dérégulation de la biosynthèse du NAD perturbe le métabolisme carboné et azoté chez *Arabidopsis thaliana*

---

La manipulation de la synthèse du NAD chez *Arabidopsis thaliana* est associée à une modification du métabolisme primaire. Les analyses métabolomiques révèlent un accroissement des teneurs en acides aminés conséquemment à une augmentation du pool de NAD et en particulier de l'Asp et de ses dérivés Asn et Met. Ces résultats corroborent de précédentes études démontrant chez un mutant mitochondrial de tabac enrichis en NAD(H) des variations substantielles des pools métaboliques et en particulier des acides aminés (Dutilleul *et al.*, 2005). Néanmoins, ce même mutant se caractérise par une augmentation pléiotrope de la photorespiration, et il semble ainsi difficile d'attribuer les perturbations métaboliques à l'augmentation du NAD ou de la photorespiration. D'autres auteurs suggèrent également que la NADK chloroplastique stimule l'assimilation carbonée et azotée chez *Arabidopsis thaliana* (Takahara *et al.*, 2010), témoignant ainsi de l'importance du NAD dans la régulation de la balance azotée/carbonée.

D'après nos analyses métabolomiques, les niveaux d'Asp diminuent dans les feuilles du *Ctrl* traitées au quinolinate, alors qu'ils augmentent chez les lignées *nadC* dans les mêmes conditions. Le quinolinate pourrait altérer certaines activités du métabolisme des acides aminés, en particulier des aminotransférases (Hsu *et Fahien*, 1976). Egalement, l'ajout de



quinolinate dans le milieu d'incubation diminuerait chez les lignées *nadC* la consommation d'Asp qui est naturellement nécessaire à la production du NAD chez les plantes. Cet acide aminé est utilisé dans de très nombreuses voies métaboliques et peut être stocké sous forme aminée, l'Asn, qui constitue la forme majoritaire de transport et de stockage d'azote réduit chez les plantes. Le profil obtenu dans notre étude diffère de celui du mutant mitochondrial *CMSII* où des niveaux élevés en NAD(H) étaient associés à une réduction drastique du pool d'Asp (Dutilleul *et al.*, 2005). De plus, l'homéostasie de l'Asp pourrait être finement régulée dans nos conditions, ce qui expliquerait une absence d'accumulation d'Asn dans les disques foliaires des lignées *nadC* traitées au quinolinate.

En outre, l'Asp peut être redirigé vers d'autres acides aminés dérivés comme la Met, la thréonine (Thr) et l'Ile. Il est intéressant de noter que ces acides aminés dérivés de l'Asp s'accumulent en réponse à l'enrichissement cellulaire en NAD (**Figure 52**). La Met est un acide aminé soufré intervenant non seulement comme *pièce angulaire* de la structure primaire des protéines, mais également comme précurseur du donneur universel de groupement méthyle, la *S*-adénosylméthionine (SAM) et son squelette carboné dérive de l'Asp chez les végétaux (Ravanel *et al.*, 1998). Un profil similaire est observé pour la Val et la Leu, composés associés à l'Ile et dont les voies de biosynthèse partagent la même machinerie enzymatique. Ces modifications métaboliques sont d'autant plus marquées pour les disques *nadC 15.3* qui accumulent davantage de NAD.

Deux raisons principales peuvent expliquer l'augmentation des niveaux en Asp. D'une part, comme discuté précédemment, l'apport exogène en quinolinate permettrait une atténuation du catabolisme de l'Asp nécessaire à la biosynthèse du NAD chez les plantes. L'Asp pourrait alors être engagé dans la synthèse d'acides aminés. D'autre part, des pools élevés en NAD(H) et NADP(H), qui agissent comme cofacteurs des enzymes bi-fonctionnelles aspartate kinases-homosérine déshydrogénases (AK-HSD), pourraient stimuler la synthèse de l'homosérine (hSer) et de ses dérivés Met, Thr et Ile. Il a notamment été montré qu'une stimulation de la production de Thr chez les plantes s'accompagne d'une accumulation concomitante du pool d'Ile (Gakière *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2007). La dégradation d'un



pool élevé de Met peut également constituer une source d'accumulation d'Ile (Rébeillé *et al.*, 2006).

En théorie, la Thr, l'Ile et la SAM dérivée de la Met peuvent exercer un rétrocontrôle négatif sur leur synthèse, mais ce rétrocontôle nécessite l'action conjuguée avec d'autres acides aminés. C'est le cas de la SAM qui nécessite des teneurs élevées en lysine (Lys) pour assurer un rétrocontrôle négatif efficace sur l'étape aspartate kinase (Curien *et al.*, 2007). La Thr n'inhibe qu'une seule des deux isoformes d'AK-HSD (Walter *et al.*, 1979). En somme, le faible rétrocontrôle négatif exercé par les produits terminaux de la voie métabolique de l'Asp permet une hausse des pools d'acides aminés dérivés de l'Asp, à l'exception de la lysine (Lys) dont ses teneurs restent inchangées dans les différentes conditions (**Figure 52**). Ce résultat reflète le contrôle étroit qu'exerce la Lys sur son propre métabolisme (synthèse et dégradation). La Lys régule négativement l'activité aspartate kinase mono-fonctionnelle et encore plus finement la première étape réactionnelle critique de sa biosynthèse, catalysée par la dihydrodipicolinate synthase (DHDPs) (Curien *et al.*, 2007; Blicing and Knäblein, 1997). Le catabolisme de la Lys permet également d'éviter une accumulation de ce composé. Les plantes sont en effet capables d'induire l'activité d'enzymes produites par le locus complexe codant la lysine cétoglutarate réductase et la saccharopine déhydrogénase (LKR-SDH) (Galili *et al.*, 2001). Il est intéressant de souligner des teneurs élevées en glutamate (Glu), produit final de la voie de catabolisme de la Lys, dans les cellules enrichies en NAD. Le Glu peut également provenir de l'Asp comme donneur d'amine à l'obscurité, via l'activité aspartate aminotransférase (Miyashita et Good, 2008).

Concernant la Ser, l'augmentation consécutive de ses niveaux chez les plantes *nadC* traitées au quinolinate et qui accumulent le NAD pourrait s'expliquer par une stimulation de la 3-phosphoglycérate déshydrogénase (3-PGDH, EC 1.1.1.95) par de forts niveaux en NAD (Ho *et al.*, 1999). L'hypothèse d'une synthèse photorespiratoire est exclue, les disques foliaires étant traités à l'obscurité.





## 2. Les teneurs élevées en NAD sont associées à une accumulation de xylose

---

L'étude métabolomique indique également une hausse des teneurs en xylose, surtout chez les plantes *nadC* enrichies en NAD après traitement au quinolinate (**Figure 53 F**). Le xylose est un aldopentose susceptible de fournir le groupement phosphoribosyle nécessaire à la synthèse du NAD (Liepman *et al.*, 2010). Il paraît peu probable que ce sucre participe à la synthèse active de PRPP. En revanche, la première étape de sa synthèse à partir de l'UDP-glucose catalysée par l'UDP-glucose-6-déshydrogénase (EC 1.1.1.22) nécessite deux molécules de NAD<sup>+</sup>. Une augmentation des niveaux de NAD est donc susceptible de stimuler cette voie de biosynthèse.

## 3. Le traitement au quinolinate entraîne une forte augmentation de nicotinate

---

Un résultat surprenant issu des données de GCMS est l'effet du traitement au quinolinate sur le pool de molécules dérivées du NAD. Les différentes lignées incubées avec du quinolinate présentent une augmentation fort conséquente des niveaux de nicotinate cellulaire (**Figure 53 E**). Cette observation laisse penser à un recyclage accru du NAD en nicotinamide puis en nicotinate (**Figure 47**), traduisant ainsi un flux exacerbé de la voie de secours des nucléotides à pyridine. Ceci peut être vrai chez les plantes *nadC* surproduisant la QPT bactérienne qui présentent également une augmentation de l'activité *in vitro* des NaPT (Chapitre I.C). Ces enzymes réalisent le transfert d'un groupement phosphoribosyle du nicotinate vers le NaMN, mais pourraient également catalyser la réaction inverse (NaMN vers nicotinate). En revanche, la lignée *Ctrl* qui n'accumule pas de NAD en réponse à l'apport exogène de quinolinate, est pourtant enrichie en nicotinate. Même s'il est envisageable que la dégradation du NaMN par les NaPT soit exacerbée, conduisant ainsi à une accumulation du pool de nicotinate, plus vraisemblablement, on peut supposer que l'enrichissement en nicotinate dans ces plantes reflète une stimulation des flux de synthèse du NAD qui n'est pas



visible si l'on considère les niveaux de NAD en raison d'un *turnover* certainement rapide. A l'appui de cette hypothèse, une élévation des teneurs en nicotinamide est également observée chez les plantes traitées au quinolinate.



## CHAPITRE III

### Réponses transcriptomiques à l'accumulation de NAD chez *Arabidopsis thaliana*



### III. Réponses transcriptomiques à l'accumulation de NAD chez *Arabidopsis thaliana*

---

#### A. Pourquoi une étude globale du transcriptome ?

---

Depuis l'apparition en 1995 de la première puce à ADN (microarray) chez *Arabidopsis thaliana*, constituée de 45 sondes fluorescentes (Schena *et al.*, 1995), le développement de la transcriptomique à grande échelle par microarray a permis l'analyse simultanée de l'ensemble des transcrits d'un génome d'une cellule dans un état physiologique donné.

#### B. Analyses transcriptomiques

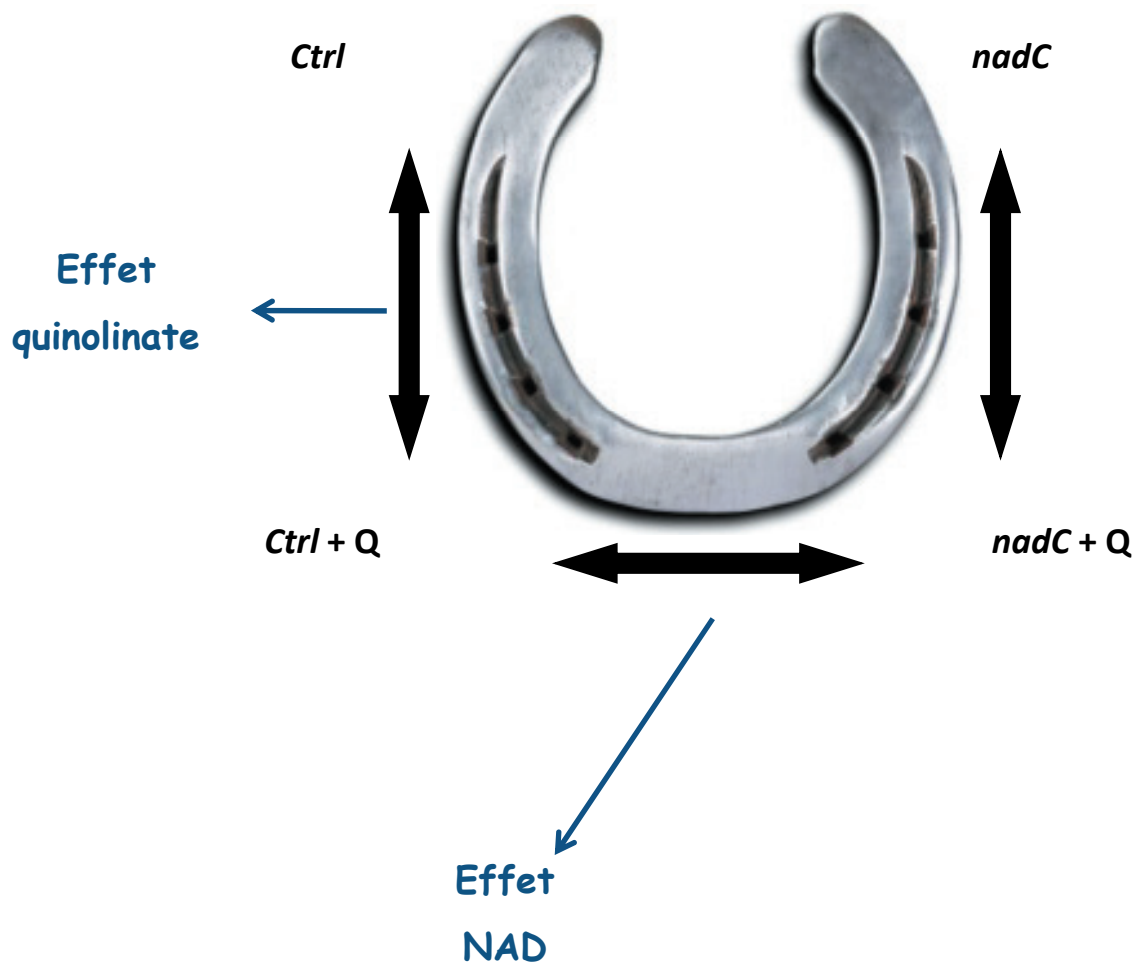
---

##### 1. La technologie CATMA

---

L'analyse microarray adoptée dans ce travail de thèse se base sur la technologie CATMA pour *Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray* (version 5) qui contient 34648 sondes correspondant à 17622 gènes annotés chez *Arabidopsis thaliana* (Sclep *et al.*, 2007). S'ajoutent également 1259 sondes associées à 521 microRNA ou siRNA. Les puces CATMA ont été utilisées dans une quarantaine de publications depuis cinq ans (Achard *et al.*, 2008 ; Besson-Bard *et al.*, 2009 ; Krinke *et al.*, 2009). Ce type de microarray est proposé par l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (Evry, France), où nous avons pu bénéficier de l'expertise de Jean-Pierre Renou (aujourd'hui à l'INRA d'Angers, France) concernant la technologie CATMA dont la couverture du génome et le coût ont été retenus dans le choix de puces à ADN.





**Figure 54. Schéma expérimental utilisé pour l'analyse transcriptomique CATMA.** La comparaison *Ctrl* + Q vs *Ctrl* permet d'évaluer l'effet d'un traitement au quinolinate alors que la comparaison *nadC* + Q vs *Ctrl* + Q permet d'analyser l'effet d'une augmentation des teneurs en NAD. Q : quinolinate.

## 2. Comparaison de type fer à cheval

---

La transcriptomique est une science qui génère un grand nombre de données et également couteuse. Une comparaison de type fer à cheval (**Figure 54**) adoptée ici permet de dissocier l'effet propre du traitement au quinolinate de celui de l'augmentation inductible en NAD chez les plantes, avec un minimum de conditions. Nous pouvons ainsi identifier les régulations transcriptionnelles spécifiques à l'enrichissement cellulaire en NAD.

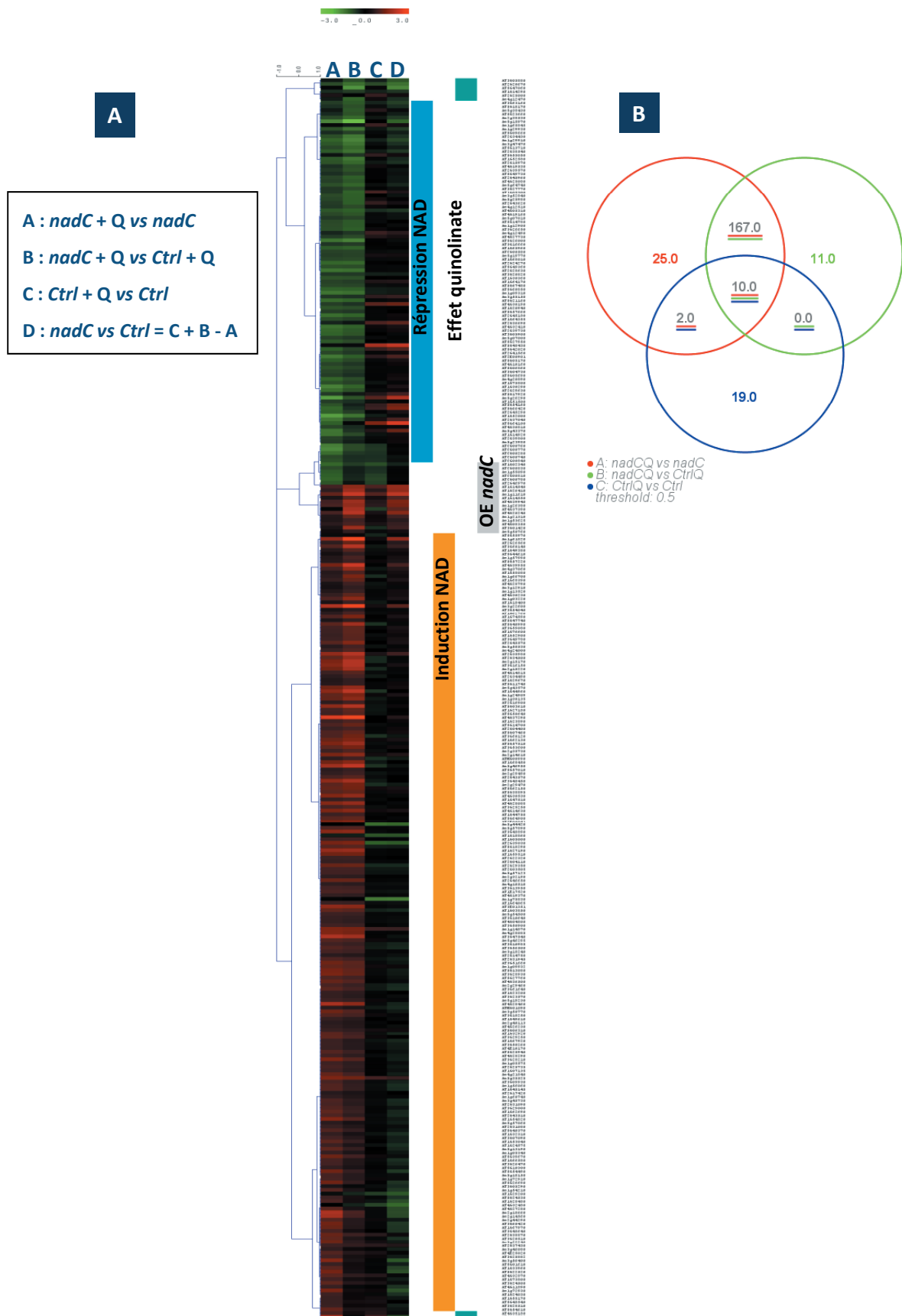
### C. Classification hiérarchique

---

La lignée *nadC 15.3* a été retenue pour l'étude transcriptomique car présentant la plus forte augmentation en NAD. La quantification des abondances relatives en messagers a été obtenue à partir d'expériences indépendantes sur des disques foliaires issus du système inductible présenté précédemment (Chapitre I). Les ARN totaux ont été extraits (voir Matériels et Méthodes) et les échantillons traités par l'URGV (Sandra Pelletier, aujourd'hui à l'INRA d'Angers, France).

Nous avons ensuite comparé différentes conditions d'hybridation présentées sur la figure de comparaison en fer à cheval (**Figure 54**) : A, *nadC* + Q vs *nadC*; B, *nadC* + Q vs Ctrl + Q; et C, Ctrl + Q vs Ctrl (Q étant le quinolinate). La comparaison manquante D, *nadC* vs Ctrl a été obtenue par un simple calcul à partir des logarithmes obtenus par l'analyse microarray :  $D = C + B - A$  (le calcul est additif car basé sur des logarithmes). Une analyse stringente a été appliquée, en considérant comme régulés de façon statistiquement significative les gènes avec une valeur P de Bonferroni inférieure à 0.05, et qui, de surcroît, montrent de façon significative des changements transcriptomiques dans la même direction pour l'ensemble des réplicats biologiques.

Dans de nombreuses études transcriptomiques, les auteurs ont recours à une classification hiérarchique qui consiste à regrouper les gènes présentant des profils d'expression proches afin de détecter des groupes de gènes co-exprimés. Nos données



**Figure 55. Une réponse transcriptomique hautement NAD-dépendante.** A : carte de chaleur de la classification hiérarchique réalisée avec le logiciel MeV sur les données CATMA. Les différentes comparaisons sont présentées dans l'encadré. À droite de la carte de chaleur figure la classification CAST (*Cluster Affinity Search Technique*). B : diagramme de Venn réalisé avec le logiciel MapMan® (seuil fixé à 0.5).

transcriptomiques ont bénéficié de cette approche. Elles ont été moyennées pour servir de base à une classification hiérarchique (HCL) effectuée grâce au logiciel MultiexperimentViewer (MeV ; voir Matériels et Méthodes). Cette première classification fournit une liste de 333 gènes dont l'expression, exprimée en  $\text{Log}_2$ , est modulée de façon statistiquement significative. En **Annexe 1** figure la liste complète de ces 333 gènes. Nous avons étoffé l'analyse par une seconde classification à l'aide de l'outil *Cluster Affinity Search Technique* (CAST) de MeV qui subdivise les résultats en 4 classes selon les conditions. Les classes 1 et 2 correspondent respectivement aux gènes NAD-réprimés et NAD-induits, la classe 3 à l'effet du quinolinate et la classe 4 à l'effet de la surexpression du gène *nadC* (condition obtenue par le calcul, en comparant *nadC vs Ctrl*). La carte de chaleur de cette seconde classification est présentée en **Figure 55 A**.

#### D. Une réponse transcriptomique hautement NAD-dépendante

---

La comparaison des conditions A et B (classes 1 et 2) révèle les gènes dont l'expression est régulée par l'augmentation en NAD. Il est intéressant de noter que la plupart des gènes induits ou réprimés dans la condition A (*nadC* + Q vs *nadC*) présente un profil d'expression semblable dans la condition B (*nadC* + Q vs Ctrl + Q) (**Annexe 1**). L'analyse hiérarchique indique très clairement un effet majeur de l'accumulation en NAD sur la transcription des gènes. En effet, la grande majorité des gènes (92 %) est régulée de façon statistiquement significative par des teneurs élevées en NAD (**Figure 55 A**). Plus exactement, 97 gènes voient leur expression réprimée contre 209 qui sont induits (classes 1 et 2 du CAST). En revanche, seuls 19 gènes sont régulés au niveau transcriptionnel en réponse au traitement au quinolinate (classe 3) et 8 uniquement répondent à la surexpression du gène *nadC* (classe 4).

Un deuxième type de représentation réalisée grâce au logiciel MapMan® confirme la réponse transcriptomique hautement NAD-dépendante observée par HCL. Il s'agit du diagramme de Venn, réalisé sur les conditions A, B et C, et dont le seuil a été fixé à 0.5 (**Figure 55 B**).

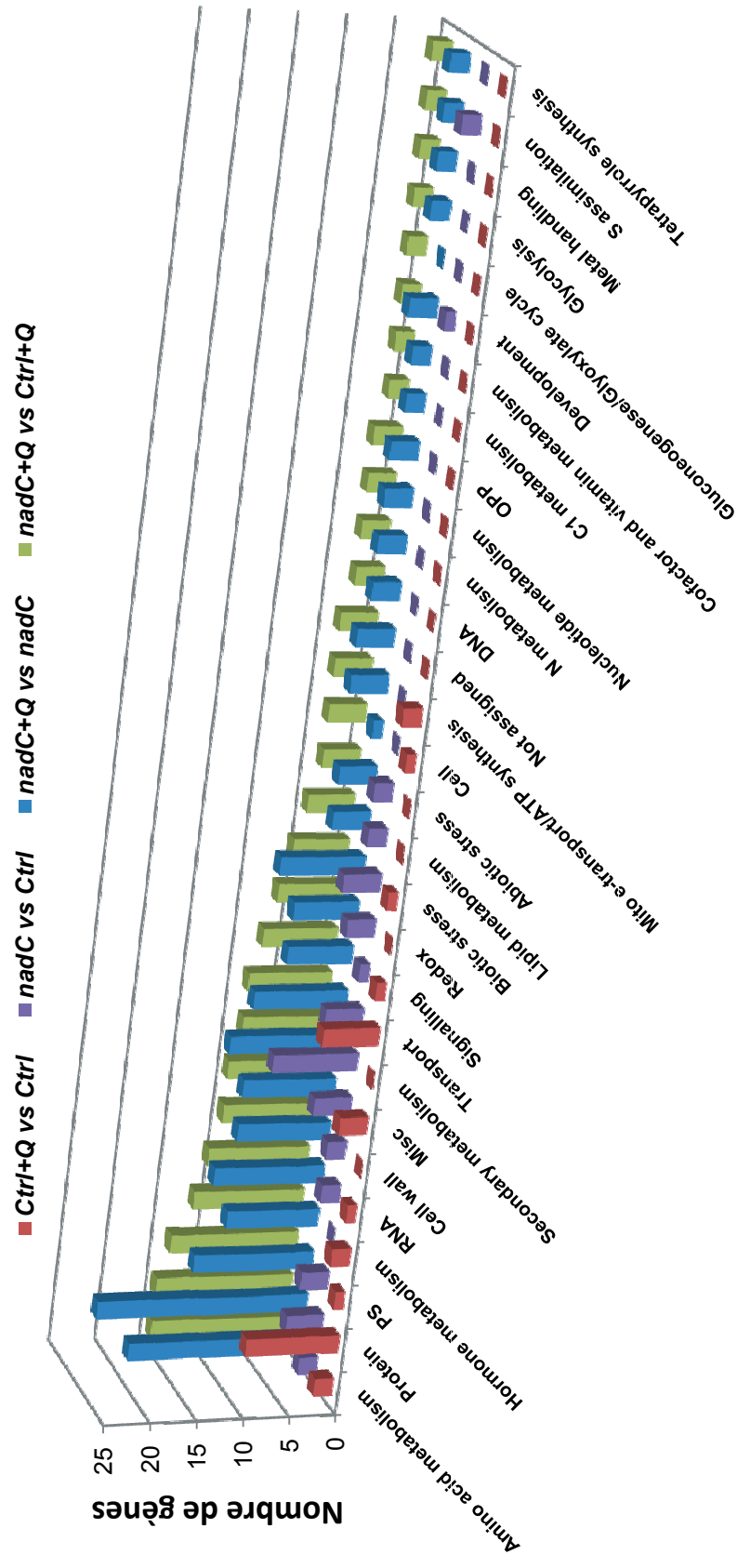


Figure 56. Classification fonctionnelle d'après les données puce à ADN CATMA. Les histogrammes ont été réalisés après classification fonctionnelle des gènes avec le logiciel MapMan®. Le nombre de gènes correspondant à une même classe a été noté et a servi à la réalisation des histogrammes.

### 1. Catégories fonctionnelles affectées par l'accumulation en NAD

---

Les catégories fonctionnelles impliquées dans une régulation du transcriptome par le NAD ont été recherchées à l'aide du logiciel MapMan®, à partir des données HCL établies dans le point précédent (conditions A, B, C et D). La représentation donnée par la **Figure 56** témoigne de l'influence du NAD sur de nombreux processus biologiques. Plus précisément, il se dégage de ces résultats une implication du NAD dans les métabolismes des acides aminés, des hormones et pariétaux, dans la photosynthèse, les protéines, les ARN, le transport, la signalisation ou encore le métabolisme rédox et la réponse aux variations environnementales (stress). Il convient de préciser cependant que ces résultats reposent uniquement sur le nombre de gènes dont l'expression est régulée, et non pas sur l'intensité des modulations.

### 2. L'augmentation foliaire en NAD induit l'expression de nombreux gènes liés aux stress, notamment biotiques

---

En regardant plus en détail la réponse transcriptomique consécutive à l'accumulation du pool de NAD, il est à constater que de nombreux gènes impliqués dans les réponses de défense des plantes sont activés (**Figure 57 A**). En effet, 34 gènes sont induits lorsque les disques foliaires accumulent du NAD, correspondant à environ 10 % des modulations transcriptomiques statistiquement significatives observées. Cet impact transcriptionnel est également vrai en termes d'intensité de modulation. En particulier, les gènes *RIN4* (*At3g48450*), *PR1* (*At2g14610*) et *GLIP1* (*At5g40990*) sont fortement induits (**Annexe 1**). Il en est de même pour d'autres gènes codant des chitinases (*At2g43570*, *At3g47540*), des protéines *PR* (*At1g52900*, *At5g43570*, *At1g72910*, *At1g27180*), des facteurs de transcriptions (TFs) *ATPEP1* (*At5g64900*), *WRKY75* (*At5g13080*) ou *CYP81F* (*At5g57220*) qui est impliqué dans le métabolisme des glucosinolates. En outre, le gène *At4g30530* qui est à la fois impliqué dans le stress biotique et le métabolisme des nucléotides est induit dans nos

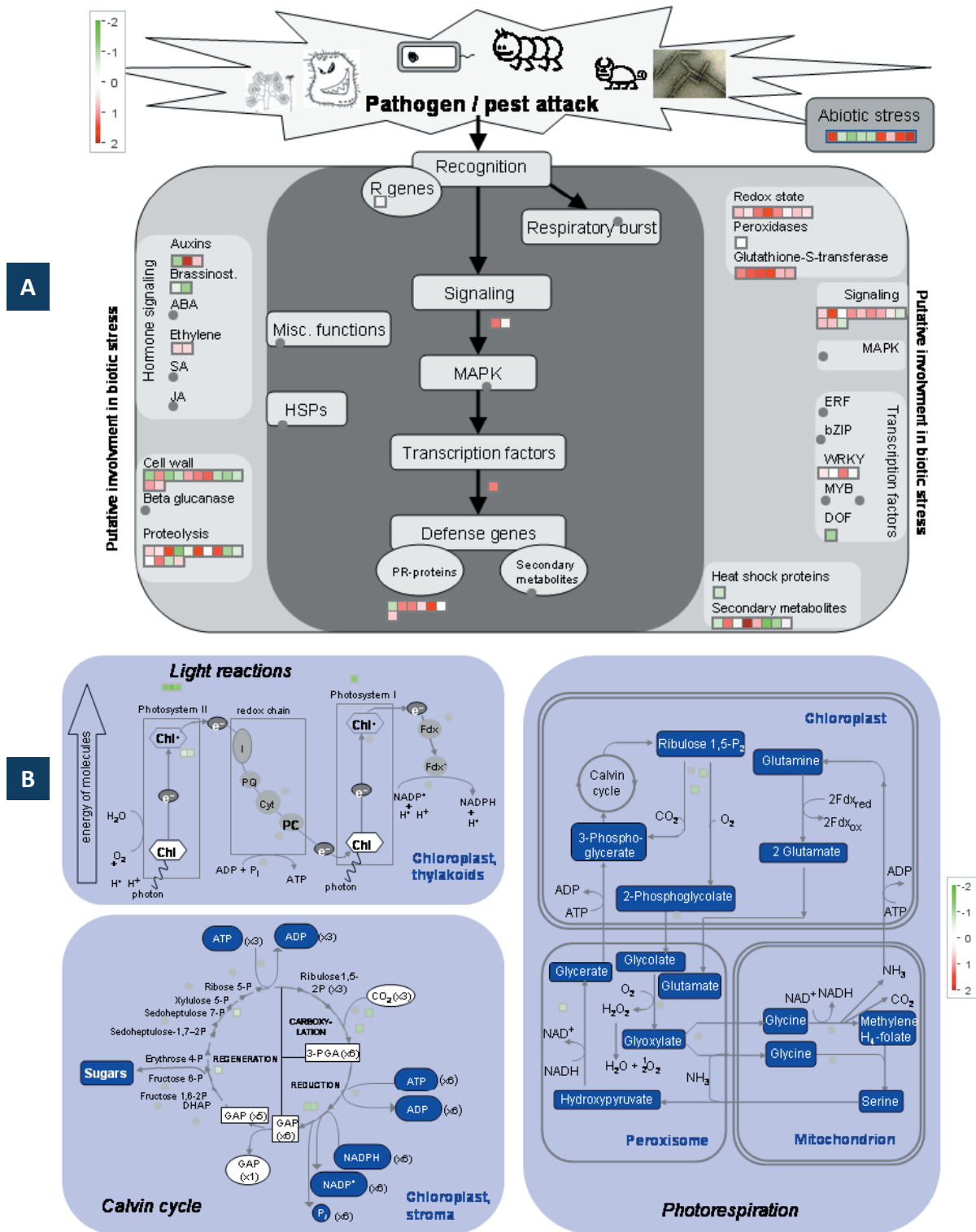


Figure 57. Diagramme métabolique illustrant l'impact d'une augmentation de NAD sur les réponses de défense des plantes et le métabolisme photosynthétique chez *Arabidopsis thaliana*. Les diagrammes A (stress biotique) et B (photosynthèse et métabolisme associé) ont été réalisés avec le logiciel MapMan® sur la condition B : *nad* + Q vs *Ctrl* + Q. En rouge figurent les gènes dont l'expression est induite dans cette condition et en vert les gènes sous-régulés au niveau transcriptionnel. Q : quinolinate.

données microarray. Il en est de même pour le gène *AIG2* (*AvrRpt2-induced gene*, *At3g28930*) et  *$\alpha$ -DOX1*, activé en réponse à l'acide salicylique et au stress oxydant (De León *et al.*, 2002). Des gènes associés aux voies de signalisation éthylène (ET) et jasmonate (JA) sont également régulés au niveau de leurs transcrits : le gène *CE11* (*cooperatively regulated by ethylene and jasmonate*, *At3g50260*) et le gène sensible au jasmonate *JAZ8* (*At1g30135*) sont induits dans nos données microarray.

En ce qui concerne la réponse aux stress abiotiques, peu de gènes sont modulés ; en revanche l'augmentation des niveaux de messagers est importante lorsque c'est le cas. Ainsi les gènes *At5g15970* (*cold-responsive 6*) et *At4g28088* (*drought/salt-responsive*) sont fortement induits. Une protéine nitrate-sensible (*At3g48450*) est également activée au niveau transcriptionnel.

### 3. Les teneurs élevées en NAD impactent également la transcription de gènes impliqués dans la signalisation calcique et dans la sénescence

---

Outre les réponses au stress, plusieurs gènes codant différentes protéines de liaison au calcium sont modérément induits par l'accumulation du pool de NAD (*At3g29000*, *At5g54490*, *At5g57010*, *At5g39670*) (**Annexe 1**). Cette réponse transcriptomique s'inscrit dans l'idée d'un rôle important pour les nucléotides à pyridine dans la signalisation calcique à travers la production de cADPR.

Un autre point marquant est l'accumulation de messagers des gènes *SAG20* (*senescence-associated gene*, *At3g10985*), *SAG13* (*At2g29350*) et *SAG24* (*At1g66580*) pour les conditions A et B. Les gènes *SAG* sont souvent associés à des phénotypes de sénescence chez les plantes et leur induction a été observée en réponse à une augmentation du pool de NAD (Schippers *et al.*, 2008).





#### 4. Une régulation transcriptionnelle du métabolisme végétal est observée consécutivement à l'augmentation en NAD

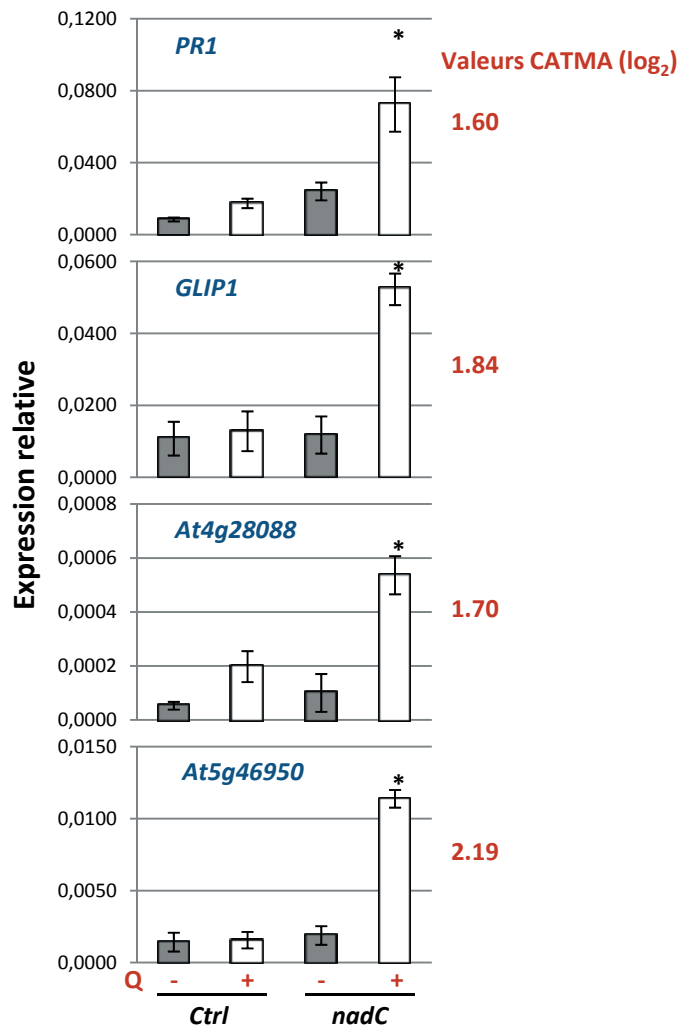
---

Étant donnée la riche réponse métabolique observée en réponse à l'accumulation en NAD (voir Chapitre II), on pouvait s'attendre à une régulation transcriptionnelle de gènes liés à des voies de biosynthèse ou de catabolisme. C'est en effet le cas, puisque plusieurs gènes impliqués dans les métabolismes primaire et secondaire voient leur expression régulée avec les fortes teneurs en nucléotides à pyridine. Notamment, deux gènes codant des beta-glucosidases *BGLU46* (impliqué dans la lignification, *At1g61820*) et *BGLU30* (également appelé *SRG2* pour *senescence related gene 2*, *At3g60140*) sont parmi les plus induits. L'accumulation des transcrits *BGLU27* (*At3g60120*) est quant à elle plus modérée. A ceci s'ajoutent des gènes codant différentes enzymes du métabolisme : deux sous-unités beta de l'anthranilate synthase (*At5g57890* et *At1g24909*), une L-asparaginase (*At3g16150*) et une indole-3-glycérol phosphate synthase (*IGPS*, *At2g04400*). Il apparait intéressant qu'une ATP phosphoribosyltransférase *ATATP-PRT1* soit substantiellement activée au niveau transcriptionnel, ainsi que des protéines du métabolisme pariétal : *EXTENSIN3* (*At1g21310*) et *AtCSLG2* (*cellulose synthase like G2*, *At4g24000*). Plusieurs gènes codant des glutathion S-transférases (*GST22* *At2g29460*, *GST19* *At2g29490*, *GSTU10* *At1g74590*, *GST21* *At2g29470*), ainsi que la protéine rédox *ATMP2* (*At3g48890*) sont induits dans les conditions de fort pool en NAD. Soulignons également l'induction des gènes *MSRB3* (*At4g04800*) et *MSRB8* (*At4g21840*) qui codent des méthionine sulfoxyde réductases (MSR).

#### 5. L'inhibition NAD-dépendante de l'expression des gènes est peu représentée, et de faible amplitude.

---

En réponse à l'augmentation du pool de NAD, plusieurs gènes sont réprimés transcriptionnellement, en particuliers des gènes impliqués dans la structure de l'appareil photosynthétique (*At1g29910*, *At2g34430*, *At3g47470*, *At1g29930*) (**Figure 57 B**) ou des



**Figure 58. Confirmation des données puce à ADN par RT-qPCR.** Une analyse transcriptomique ciblée par RT-qPCR sur différents gènes modulés de façon statistiquement significative dans les données CATMA (valeurs en rouge, exprimées en Log<sub>2</sub>) permet de confirmer les régulations observées. Les résultats, exprimés en expression relative par rapport au gène de référence *ACT2* (*At3g18780*), correspondent à quatre échantillons biologiques indépendants,  $\pm$  SE de quatre mesures. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au contrôle correspondant, ici *Ctrl* + Q (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student). *At4g28088* et *At5g46950* : gènes de fonction biologique non clairement identifiée ; *GLIP1* : lipase GLIP1 ; *PR1* : *Pathogen Related 1*.

gènes associés au métabolisme pariétal : *CESA6* et *CESA1* (*cellulose synthase isomer*, *At5g64740* et *At4g32410*, respectivement). Enfin, les teneurs élevées en NAD inhibent l'expression de gènes du métabolisme des glucosinolates (*BGLU38* et *BGLU37*), le gène de priming du SA *AZI1* (*azelaic acid induced 1*, *At4g12470*, Jung *et al.*, 2009), ainsi que *PAL1* qui code une phénylalanine ammonia-lyase (*At2g37040*).

#### 6. Le traitement au quinolinate implique une réponse transcriptomique faible

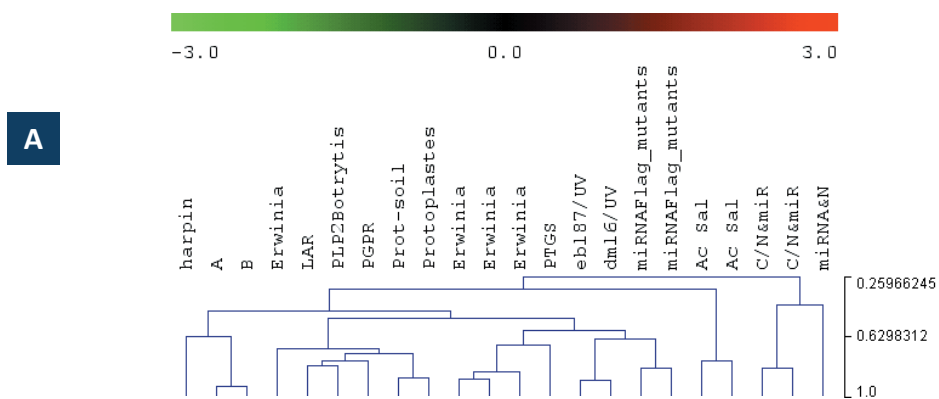
---

L'induction de l'abondance en transcrits par le traitement au quinolinate apparaît relativement modeste (**Annexe 1**), à l'exception de quelques gènes codant une protéine de fonction inconnue possédant un domaine endopeptidase aspartique (*At5g48430*), des protéines rédox comme une peroxydase (*At5g64100*) et une oxidoréductase (*At2g36690*), ou encore l'ATPase *AHA2* (*At4g30190*). Trois gènes sensibles au cadmium (*At1g14870*, *At1g14880* et *At5g35525*) sont également activés, à l'instar d'un gène lié à un transporteur de zinc (*At1g05300*). Un nombre encore plus restreint de gènes sont substantiellement sous-régulés par l'ajout de quinolinate : deux gènes codant des défensines (*At5g44420*, *At1g75830*), ainsi qu'un gène codant une acétylCoA N-acétyltransférase (*At2g39030*). Inversement, ce dernier gène est activé dans les conditions A (*nadC* + Q vs *nadC*) et B (*nadC* + Q vs *Ctrl* + Q).

#### E. Validation des données CATMA par confirmation RT-qPCR

---

Afin de valider les données microarray obtenues avec la technologie CATMA, une confirmation par RT-qPCR du niveau d'expression de certains gènes a été réalisée dans quatre échantillons biologiques indépendants (**Figure 58**). Deux types de gènes ont été choisis. D'une part, des gènes dont l'abondance en transcrits est modérée ou élevée et



**B**

Nodes	Experiments		Distance
Node_0	<b>A (nadC+Q vs nadC)</b>	<b>B (nadC+Q vs Ctrl+Q)</b>	0.07383299
Node_1	ebl87/UV	dml6/UV	0.11371237
Node_2	Erwinia	Erwinia	0.11723989
Node_3	Prot-soil	Protoplastes	0.12403607
Node_4	Node_2	Erwinia	0.16423666
Node_5	C/N&miR	C/N&miR	0.18726146
Node_6	miRNAFlag_mutants	miRNAFlag_mutants	0.18728113
Node_7	LAR	PLP2Botrytis	0.19753581
Node_8	Ac Sal	Ac Sal	0.2282443
Node_9	Node_7	PGPR	0.23244703
Node_10	Node_9	Node_3	0.27623183
Node_11	Erwinia	Node_10	0.30052382
Node_12	Node_4	PTGS	0.32466513
Node_13	Node_1	Node_6	0.3614064
Node_14	harpin	Node_0	0.3812266
Node_15	Node_12	Node_13	0.4158674
Node_16	Node_11	Node_15	0.48522526
Node_17	Node_14	Node_16	0.531201
Node_18	Node_5	miRNAC&N	0.5720123
Node_19	Node_17	Node_8	0.6665712
Node_20	Node_19	Node_18	0.74033755

**Figure 59. Comparaison des profils d'expression des conditions A et B avec d'autres données transcriptomiques CATMA.** A : détail de l'HCL présentée en **Annexe 2**. B, tableau indiquant les expériences dont les profils transcriptomiques sont les plus proches de ceux obtenus dans nos conditions A et B (augmentation de NAD). Le nom des expériences fait référence à la nomenclature CATdb. Les distances ont été calculées selon une corrélation de Pearson, par le logiciel Mev. En rouge figurent les conditions liées aux stress biotiques. Ac. Sal : acide salicylique ; LAR : résistance locale acquise ; Node : nœud. Autres abréviations : voir texte. Ces recoupements reposent sur la base de 647 analyses transcriptomiques CATMA.

codant des protéines connues. C'est le cas pour les gènes *PR1* et *GLIP1* tous deux impliqués dans les réponses de défense des plantes (Malamy *et al.*, 1990 ; Ryals *et al.*, 1996 ; Kwon *et al.*, 2009). D'autre part, ont également été vérifiés des gènes marqueurs de stress modérément ou fortement exprimés mais dont la fonction protéique n'est pas établie (*At4g28088*, *At5g46950*). Comme en témoigne la **Figure 58**, pour ces deux types de gènes, l'induction de leur expression observée par l'analyse CATMA (**Annexe 1**) est confirmée en RT-qPCR.

#### F. Comparaison avec d'autres données transcriptomiques

---

L'analyse transcriptomique s'est poursuivie en confrontant les profils d'expression des gènes modulés dans nos expériences avec d'autres profils disponibles dans la base de données CATMA (collaboration Jean-Pierre Renou). Cette approche originale permet de détecter des conditions (traitements, stress, lignées mutantes, etc.) pour lesquelles la modulation de l'expression des gènes est proche de celle observée pour nos résultats et ainsi de mettre en évidence des régulons génétiques.

Une classification hiérarchique a été réalisée, en portant un intérêt particulier aux conditions pour lesquelles les teneurs en NAD étaient fortement augmentées (**Figure 59**). En **Annexe 2** figure l'HCl complète. Les conditions A (*nadC* + Q vs *nadC*) et B (*nadC* + Q vs *Ctrl* + Q) se recoupent avec des profils d'expression associés au stress biotique (**Figure 59**, les projets dénommés ci-contre sont issus de références CATdb, <http://urgv.evry.inra.fr/CATdb>). Citons notamment des traitements avec la harpine, l'acide salicylique (AU07-01\_PLD-SA), ou l'éliciteur flagelline (RS06-06\_miRNA). Cette dernière molécule est connue pour intervenir dans des réponses de défense (Navarro *et al.*, 2004). En outre, nos profils transcriptomiques se rapprochent de ceux obtenus lors d'infections par des agents phytopathogènes (*Erwinia amylovora*: RA05-02\_Erwinia ; *Botrytis cinerea*: AF13\_PLP2), ou encore durant la LAR (Localized Acquired Resistance: TRI38-LAR). Cette dernière expérience correspond à une élévation de la réponse hypersensible (HR) après inoculation avec la souche avirulente de *Pst DC3000* porteuse du gène d'avirulence *AvrRpm1*. En ce qui concerne l'effet du



traitement au quinolinate sur le transcriptome (condition C, *Ctrl* + Q vs *Ctrl*, **Annexe 3**), l'analyse HCL indique des profils d'expression de gènes proches de ceux rencontrés dans des expériences de traitements par l'acide phosphatidique (PA) et le diacylgcérol pyrophosphate (DGPP) qui est un second messenger impliqué dans la signalisation de l'acide abscissique (RS05-06\_DGPP) (**Annexe 3**). Ces dernières expériences ne présentent pas de similarité avec les stress biotiques.

## G. Conclusion et discussion

---

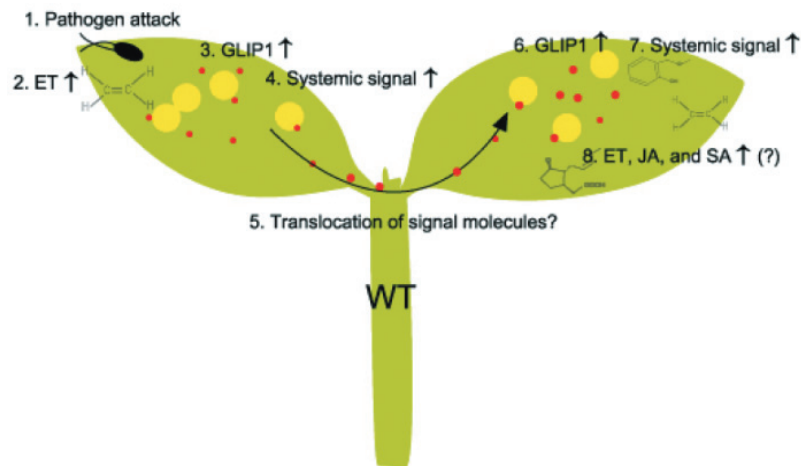
### 1. Une réponse transcriptomique étroitement liée au stress biotique

---

La résistance systémique acquise (SAR) est un mécanisme de défense bien décrit, impliquant un burst oxydant, l'accumulation de la molécule signal SA et l'expression de gènes *PR* comme *PR1*, *PR2* et *PR5* dans les tissus infectés (Malamy *et al.*, 1990 ; Ryals *et al.*, 1996). Le SA peut interagir avec le NO et les ROS, induisant alors la mort cellulaire attenante à la HR (Delledonne *et al.*, 1998). Les données transcriptomiques obtenues dans notre étude du système *nadC* de surproduction inductible de NAD mettent en lumière la régulation de gènes associés au métabolisme rédox et généralement exprimés en condition de HR :  $\alpha$ -*DOX1*, qui est induit au cours d'infections bactériennes compatible et incompatible (De León *et al.*, 2002), et plusieurs gènes codant des GSTs (*GST22*, *GST19*, *GSTU10*, and *GST21*), dont on suppose leur participation dans la péroxydation enzymatique du glutathion (Durrant and Dong, 2004). Néanmoins, la quantification des pools réduits et oxydés de glutathion (Chapitre I) ne met pas en évidence de modification substantielle du rapport GSSG/GSH dans ces conditions (*nadC* traité au quinolinate, accumulant du NAD).

Dans le présent travail, nous avons également établi qu'une surproduction de QPT, augmentant le pool de NAD, induit au niveau transcriptionnel des réponses de défense associées au SA. Cette conclusion découle de l'analyse microarray révélant des profils d'expression de gènes comparables à ceux obtenus lors de traitement au SA, comme en





**Figure 60. Implication possible de la lipase GLIP1 dans la résistance systémique.** Lors d'une attaque pathogène (1), une induction dépendante de l'éthylène (ET) est observée pour le gène *GLIP1* (2, 3). La lipase *GLIP1* est associée à la production d'un signal systémique qui est transloqué vers des tissus non infectés (4, 5). Le signal mobile conduit à la synthèse de protéines *GLIP1* qui stimulent l'accumulation de molécules signal dans les tissus systémiques (6, 7). Cette réaction en chaîne de *GLIP1* et le signal systémique pourrait amplifier et propager la résistance systémique dans toute la plante. Les niveaux d'acide salicylique (SA), d'acide jasmonique (JA) et d'ET pourraient également augmenter dans les tissus systémiques, conférant à la plante une résistance à large spectre (8). Les protéines *GLIP1* et les molécules signal sont représentées par des symboles jaunes et rouges. WT : wild type (plante sauvage). D'après *Kwon et al. (2009)*.

témoigne la classification hiérarchique effectuée entre nos résultats et la bibliothèque de données CATMA (**Figure 59**). Il est également intéressant de signaler que nos données transcriptomiques se regroupent avec des expériences d'élicitation de la HR suite à l'infection par la bactérie avirulente *Pst-AvrRpm1*.

Outre l'effet du NAD mimant une réponse transcriptomique associée au SA, il convient d'ajouter qu'un enrichissement en nucléotides à pyridine impacte d'autres voies de signalisation impliquées dans les stress biotiques. Notons en particulier la forte induction du gène de lipase *GLIP1* qui s'inscrit dans une transduction du signal indépendante du SA, en élicitant la signalisation ET conduisant ainsi à une résistance à divers pathogènes ([Kwon et al., 2009](#)) (**Figure 60**). D'autres gènes liés aux voies ET et JA sont induits par le NAD, comme *CEJ1* et *JAZ8*.

## 2. Le NAD affecte l'expression de gènes liés au métabolisme

---

L'enrichissement en NAD chez *Arabidopsis thaliana* est associé à une augmentation de l'Asp et de ses dérivés (Chapitre II). Cette réponse métabolomique s'accompagne également d'une régulation du niveau des transcrits de gènes du métabolisme. Nous discutons dans le Chapitre II des raisons pouvant expliquer l'augmentation du pool d'Asp consécutivement à l'accumulation du NAD. Dans ces conditions, les teneurs en Asp sont vraisemblablement sous contrôle homéostatique et l'accumulation d'Asn semble évitée. Cette hypothèse est étayée par l'induction du gène codant l'asparaginase 2 (*At3g16150*), révélée par l'analyse transcriptomique. Cette observation n'est pas retrouvée chez le mutant mitochondrial *CMSII* dont le pool en NAD(H) est augmenté ([Dutilleul et al., 2005](#)). Chez ce dernier les niveaux d'Asp s'écroulent et les teneurs en Asn augmentent fortement. Il est possible chez *CMSII* que l'activité asparaginase ne soit pas stimulée, ce qui expliquerait cette différence.

Intrinsèquement, les acides aminés sont très sensibles à certains ROS tels que le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ), notamment les acides aminés soufrés comme la Met qui s'oxyde en



méthionine sulfoxyde (MetSo). Cette oxydation de la Met aboutit à un remaniement de la structure des protéines, ce qui altère leur activité (pour revue voir Davies, 2005). Il existe cependant des mécanismes biochimiques catalysés par les méthionine sulfoxyde réductases (MSR) qui réduisent les Met-R-sulfoxydes s'opposant ainsi aux phénomènes d'oxydation (Rouhier *et al.*, 2006). D'après nos analyses microarray, deux gènes de MSR sont induits (*MSRB3*, *At4g04800* et *MSRB8*, *At4g21840*) dans les conditions où le NAD et la Met s'accumulent. Oh *et al.* (2005) ont également rapporté que des traitements à l'ABA, au NaCl et au froid, connus pour générer un stress secondaire oxydant, augmentaient les niveaux de messagers *MSRB3*. De même, il est possible que des réactions d'oxydation interviennent dans nos conditions, comme suggéré par l'augmentation du rapport GSSG/GSH dans le *Ctrl* traité au quinolinate. Pourtant, les disques *nadC* enrichis en NAD ne présentent pas de modification de la balance rédox stationnaire. Il n'en demeure pas moins que l'induction observée de gènes codant des protéines rédox (péroxydase, oxydoréductases, MSR) puisse traduire une possible stimulation oxydante. En d'autres termes, ces observations rejoignent l'idée d'une perturbation de l'état redox cellulaire en réponse à l'accumulation de NAD.

L'analyse du métabolome montrait un enrichissement en xylose dans les lignées *nadC* accumulant du NAD (Chapitre II). Des niveaux stationnaires élevés en xylose étaient *a priori* expliqués par la nécessité de fournir des groupements phosphoribosyles pour la synthèse du dinucléotide (Chapitre II). De façon plus hypothétique, le xylose, qui constitue un résidu de l'hémicellulose pariétale, pourrait interagir avec le métabolisme de la paroi végétale, qui dépend de cofacteurs comme le NAD(P)H. Dans ce contexte métabolique précis, nous observons l'induction du gène *AtCSLG2* impliqué dans le métabolisme de la cellulose. De plus, des modifications pariétales peuvent également opérer au cours des réactions de défense des plantes et nécessiter des précurseurs comme le xylose lors du réarrangement des structures de la paroi (Liepman *et al.*, 2010). Enfin, des teneurs augmentées en xylose peuvent aussi refléter une stimulation des métabolismes du 2,3-DHBA (acide dihydroxybenzoïque) et du SA, tous les deux sous-jacents à l'établissement de la SAR (Bartsch *et al.*, 2010).



### 3. Effet toxique du quinolinate

---

La réponse transcriptomique de l'effet quinolinate apparait faible d'une part en termes de nombre de gènes modulés de façon statistiquement significative et d'autre part dans l'intensité de ces régulations. Il n'en demeure pas moins que parmi les gènes induits, trois gènes liés au cadmium et un associé au transport du zinc ressortent des analyses transcriptomiques. En regard de l'oxydation du glutathion chez le *Ctrl* traité au quinolinate (Chapitre II), il est aisé de supposer que le quinolinate serait une molécule toxique si non métabolisée, engendrant un stress oxydant similaire à celui mesuré lors de traitements par certains métaux lourds comme le cadmium ou le zinc (Herbette *et al.*, 2006).



## CHAPITRE IV

**L'enrichissement en NAD élicite les réactions de défense  
conduisant à une résistance à la bactérie avirulente  
*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* AvrRpm1**





#### IV. L'enrichissement en NAD élicite les réactions de défense conduisant à une résistance à la bactérie avirulente *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* AvrRpm1

---

##### A. Pourquoi une étude physiologique des interactions plantes *nadC*-pathogènes?

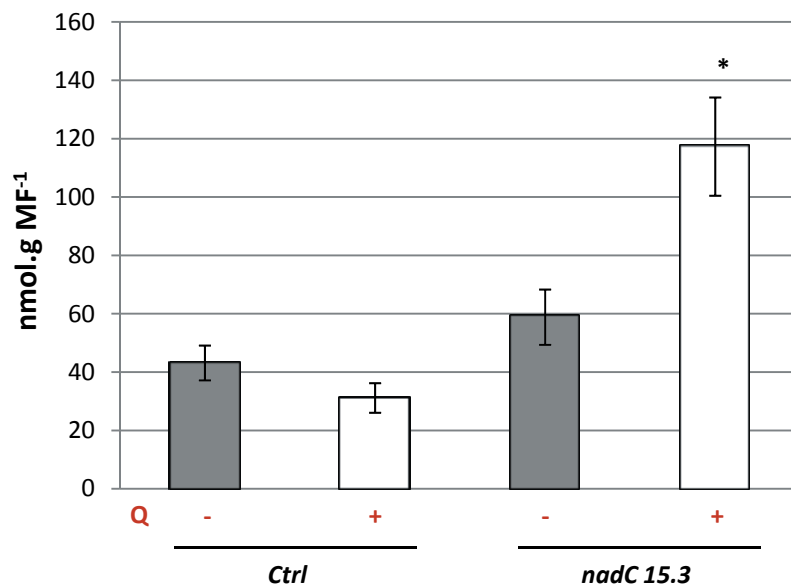
---

En dépit du fait que plusieurs travaux suggèrent une implication du NAD dans la tolérance des plantes aux stress, aucun effet direct intracellulaire des nucléotides à pyridine dans ce contexte physiologique n'a encore été démontré. L'étude du transcriptome présentée précédemment suggère un lien étroit entre l'homéostasie du NAD et la réponse aux stress, en particulier biotiques. L'objectif du travail était de comprendre quelles étaient les conséquences d'une augmentation de NAD sur la physiologie des plantes, notamment en conditions de stress. Pour investiguer cette problématique, et compte tenu de l'importante induction de *PR1* et d'autres gènes liés aux stress biotiques, l'analyse des lignées *nadC* a été étendue par des tests de résistance à des agents pathogènes et la mesure de marqueurs de défense.

##### B. Choix de la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*)

---

Le choix de l'agent pathogène s'est porté sur la bactérie Gram-négative *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*). Le laboratoire dispose de deux souches bactériennes : l'une virulente, notée *DC3000*, l'autre avirulente car porteuse du gène d'avirulence *AvrRpm1* (*Pst-AvrRpm1*) (Glazebrook et Ausubel, 1994). L'utilisation de l'une ou l'autre des deux souches permet de se placer dans le cadre d'une interaction compatible (souche virulente) ou incompatible, répondant au concept d'interaction gène-pour-gène (souche avirulente). *Pst* est un microorganisme hémibiotrophe et sa souche avirulente *Pst-AvrRpm1* provoque chez *Arabidopsis thaliana* des symptômes de HR qui aboutissent à la mort rapide des cellules végétales infectées et à la restriction de la bactérie au voisinage



**Figure 61. Mesure des niveaux de NAD<sup>+</sup> après infiltration foliaire de quinolinate.** Des feuilles des lignées *Ctrl* et *nadC 15.3* ont été infiltrées avec 5 mM de quinolinate (pH 6). Deux jours après ce traitement, les feuilles sont collectées et les teneurs en NAD<sup>+</sup> sont quantifiées. Les histogrammes représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants, ± SE de trois mesures. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* + Q (\* P < 0.05, test t de Student). Q : quinolinate.

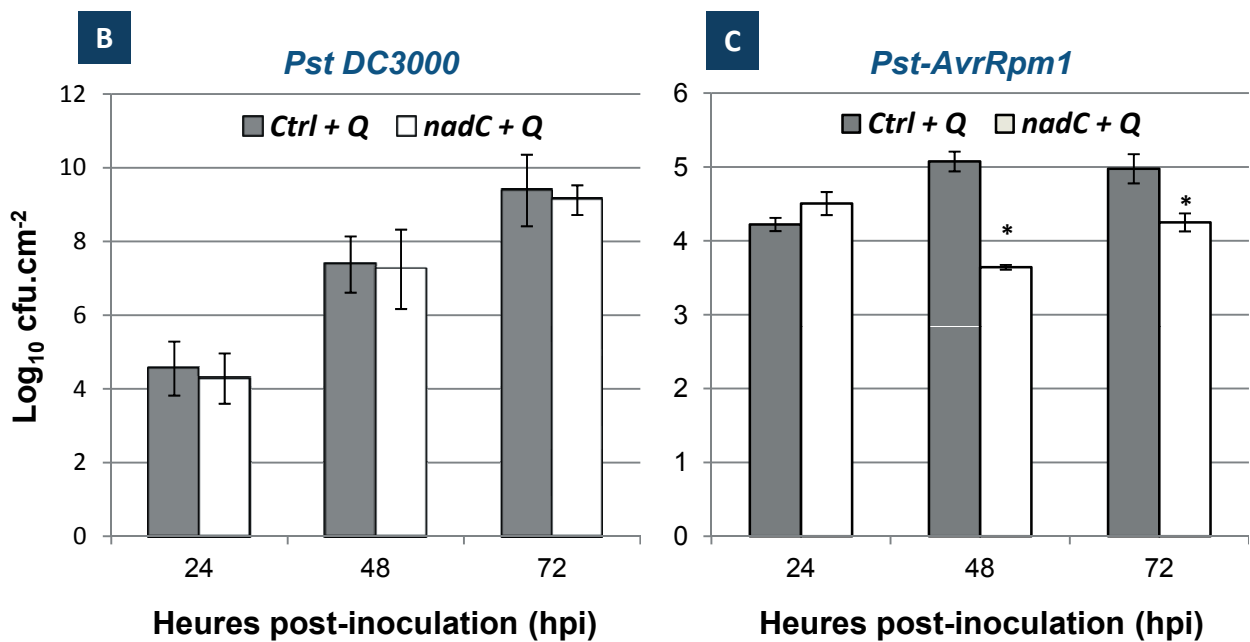
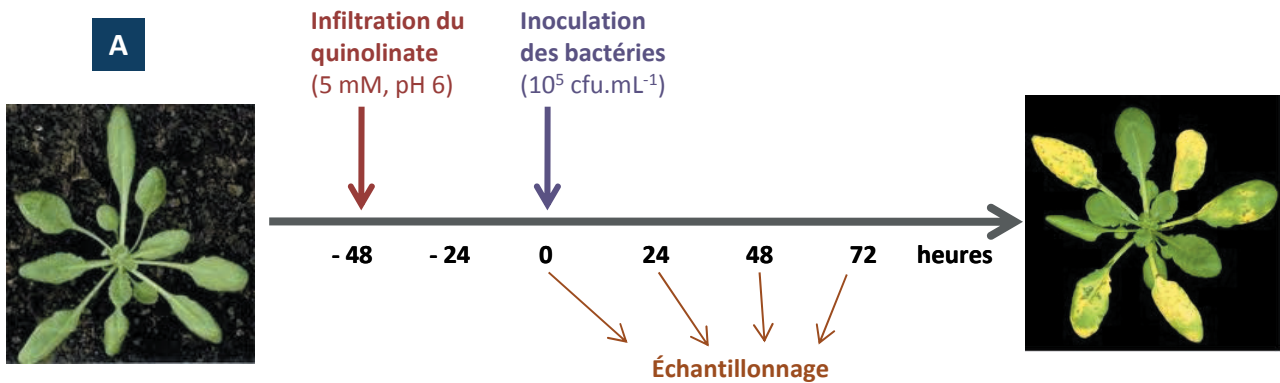
immédiat du site d'infection (Dangl *et al.*, 1996 ; Mur *et al.*, 2008). De nombreux travaux ont contribué à la description symptomatique et moléculaire de ce pathosystème. Entre autre, le partenaire végétal réagit à l'infection par une cascade de signalisations qui impliquent la production de ROS, l'induction de gènes *PR*, l'accumulation de SA, et aboutissent à la production de métabolites secondaires de défense (Lamb and Dixon, 1997 ; Mur *et al.*, 2008 ; Simon *et al.*, 2010).

Le recours aux tests de résistance aux microorganismes nécessite de réaliser des expériences *in planta*, et non pas sur les disques foliaires utilisés dans les chapitres I à III. Par conséquent, un système alternatif *plus physiologique* a été développé et repose sur une infiltration à la seringue de quinolinate. Un dosage du NAD<sup>+</sup> a été réalisé 48 h après infiltration au quinolinate (temps d'incubation des disques) et révèle une augmentation du pool de NAD<sup>+</sup> dans les feuilles *nadC* intactes infiltrées avec le quinolinate (**Figure 61**), validant ainsi un système inductible *in planta* de surproduction de NAD. De façon surprenante, l'accumulation anthocyanique observée sur les disques foliaires illuminés en présence de quinolinate n'a pas été retrouvée pour l'infiltration des feuilles maintenues en chambre de culture *Jours Courts* (photopériode 8 h de lumière).

### C. L'augmentation en NAD entraîne une résistance à *Pst AvrRPM1*

---

Sur des plantes *Ctrl* et *nadC 15.3* âgées de 5 à 6 semaines (stade rosette) et cultivées en chambre de culture *Jours Courts*, des feuilles ont été infiltrées avec une solution de quinolinate de concentration 5 mM tamponnée à pH 6, à l'aide d'une seringue dépourvue d'aiguille. Deux jours après, les mêmes feuilles ont été inoculées avec une suspension bactérienne de concentration 10<sup>5</sup> cfu.mL<sup>-1</sup> de souches virulente *Pst DC3000* ou avirulente *Pst-AvrRpm1* (**Figure 62 A**). En parallèle, des plantes témoins ont été infiltrées par un tampon mock (MgCl<sub>2</sub>). Les symptômes occasionnés ont été suivis pendant 72 h et toutes les 24 h, un échantillonnage a été réalisé afin de déterminer la croissance bactérienne des feuilles infectées. Le comptage des bactéries *Pst DC3000* ne montre pas de différence



**Figure 62. Tests de résistance de plantes d'*Arabidopsis thaliana* à la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*).** A : Des feuilles des lignées *Ctrl* et *nadC 15.3* ont été infiltrées avec 5 mM de quinolinate (pH 6). Deux jours après ce traitement, les feuilles sont inoculées avec les souches virulentes (*Pst DC3000*) ou avirulente (*Pst-AvrRpm1*) de *Pst*. B et C : analyses de la croissance bactérienne de 24 à 72 heures post inoculation (hpi). Les résultats sont exprimés en Log en base 10 par cm<sup>2</sup> et correspondent à cinq réplicats biologiques indépendants,  $\pm$  SE de cinq mesures. L'expérience a été répétée trois fois. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* traité au quinolinate (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student). Q : quinolinate.

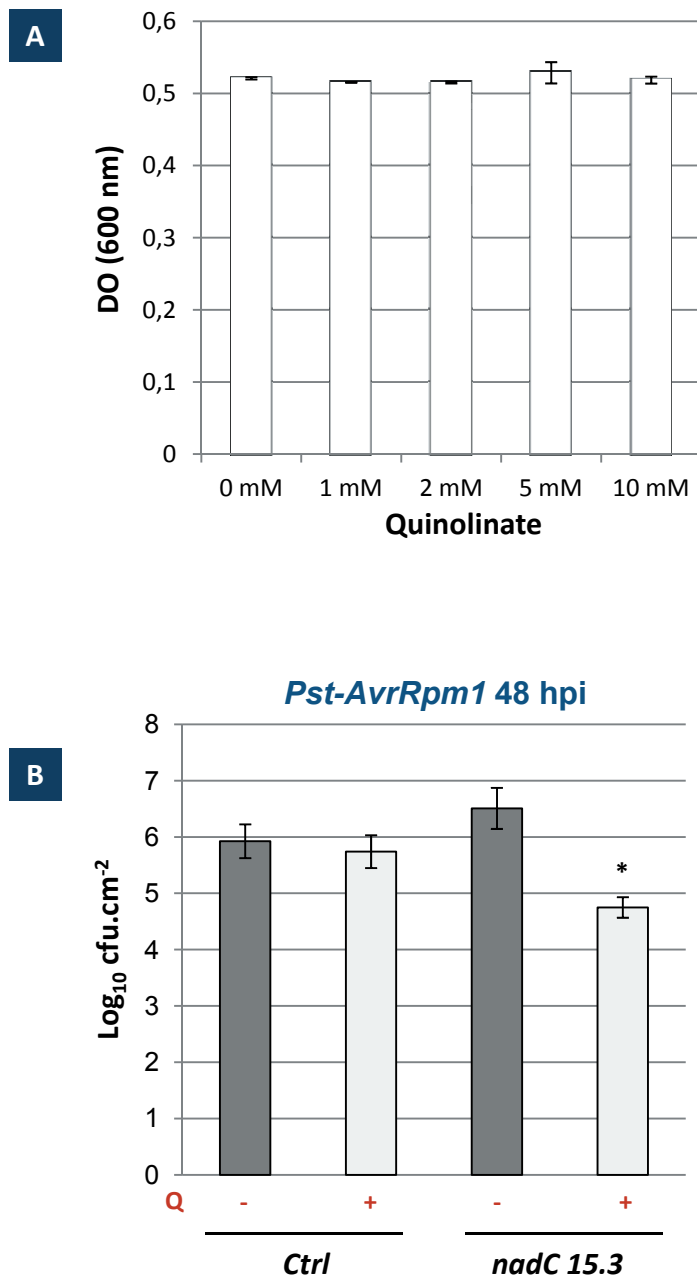
significative dans les lignées testées (**Figure 62 B**). A la fois chez le *Ctrl* et la lignée *nadC*, la population bactérienne croît de 24 à 72 heures post-inoculation (hpi), suggérant que les défenses basales ne sont pas affectées par les niveaux en NAD élevés. Toutefois, lorsqu'on inocule la souche avirulente *Pst-AvrRpm1* dans les feuilles *nadC* préalablement infiltrées au quinolinate, la population bactérienne décroît significativement à 48 hpi par rapport au *Ctrl* traité au quinolinate (**Figure 62 C**). Cette résistance persiste à 72 hpi.

Le recours à un traitement chimique exogène pour augmenter le NAD (acide quinolinique) soulève la question d'un possible effet bactériostatique ou toxique du quinolinate sur *Pst*. Cette hypothèse a été testée par différentes approches. Premièrement, puisque le milieu foliaire rencontré par les bactéries se rapproche plus d'un milieu fluide ou liquide, la croissance bactérienne a été mesurée en culture liquide additionnée de différentes concentrations de quinolinate (**Figure 63 A**). Des mesures de DO à 600 nm n'indiquent pas de différences dans les populations bactériennes (*Pst-AvrRpm1*). Deuxièmement, nous avons vérifié la croissance des bactéries dans des feuilles *Ctrl* ou *nadC 15.3* infiltrées ou non au préalable par la solution initiale de quinolinate (5 mM, pH 6). La **Figure 63 B** souligne une croissance bactérienne réduite à 48 hpi dans les feuilles *nadC* traitées au quinolinate ; en revanche, aucune différence statistiquement significative est à noter dans les feuilles *Ctrl* infiltrées ou non infiltrées avec l'acide quinolinique. Nous pouvons ainsi affirmer que la résistance à *Pst-AvrRpm1* observée chez les plantes *nadC* n'est pas attribuée à la toxicité du quinolinate. En somme, la surexpression du gène *nadC* induit la résistance à *Pst-AvrRpm1* en réponse à l'augmentation en NAD, alors que les défenses basales ne sont pas substantiellement affectées.

### D. La résistance est corrélée à l'activation de marqueurs de défense

---

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en place lors de la résistance à la bactérie avirulente chez les lignées enrichies en NAD, l'étude a été étendue à la mesure de marqueurs de défense communément vérifiés au cours d'interactions plantes-



**Figure 63. Toxicité du quinolinate sur la croissance bactérienne de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*).** A : estimation de la population en bactéries *Pst-AvrRpm1*, en milieu LB liquide supplémenté en quinolinate de concentration croissante. B : analyse de la croissance bactérienne *in folia* de *Pst-AvrRpm1* à 48 hpi. Les histogrammes représentent la moyenne de quatre échantillons indépendants,  $\pm$  SE de quatre mesures. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* traité au quinolinate (\* $P < 0.05$ , test *t* de Student).

agents pathogènes. Des données phytopathologiques issues de la littérature ont montré lors d'infections par des microorganismes une induction des gènes *PR* et *ICS1* (Glazebrook *et al.*, 2003). D'autres travaux ont démontré que le gène *ICS1* intervenait dans la production de SA par la voie du chorismate, participant alors à l'établissement de la résistance (Wildermuth *et al.*, 2001). C'est dans ce contexte moléculaire que nous avons quantifié par RT-qPCR le niveau des transcrits *PR1* et *ICS1*. Nous nous sommes placés à 48 hpi, temps de la cinétique d'infection caractérisé par la plus grande résistance à *Pst-AvrRpm1*. En réponse à l'infection bactérienne, nous avons remarqué une induction des gènes *PR1* et *ICS1* (Figures 64 A et B), corroborant ainsi des résultats précédents (Wildermuth *et al.*, 2001; Glazebrook *et al.*, 2003). Il n'en demeure pas moins frappant que le niveau d'expression de ces deux gènes liés à la réponse SA s'accroît considérablement dans les conditions où le NAD s'accumule (*nadC* + Q) (Figures 64 A et B). Ceci est vrai chez les plantes témoins (mock) et celles inoculées avec *Pst-AvrRpm1*.

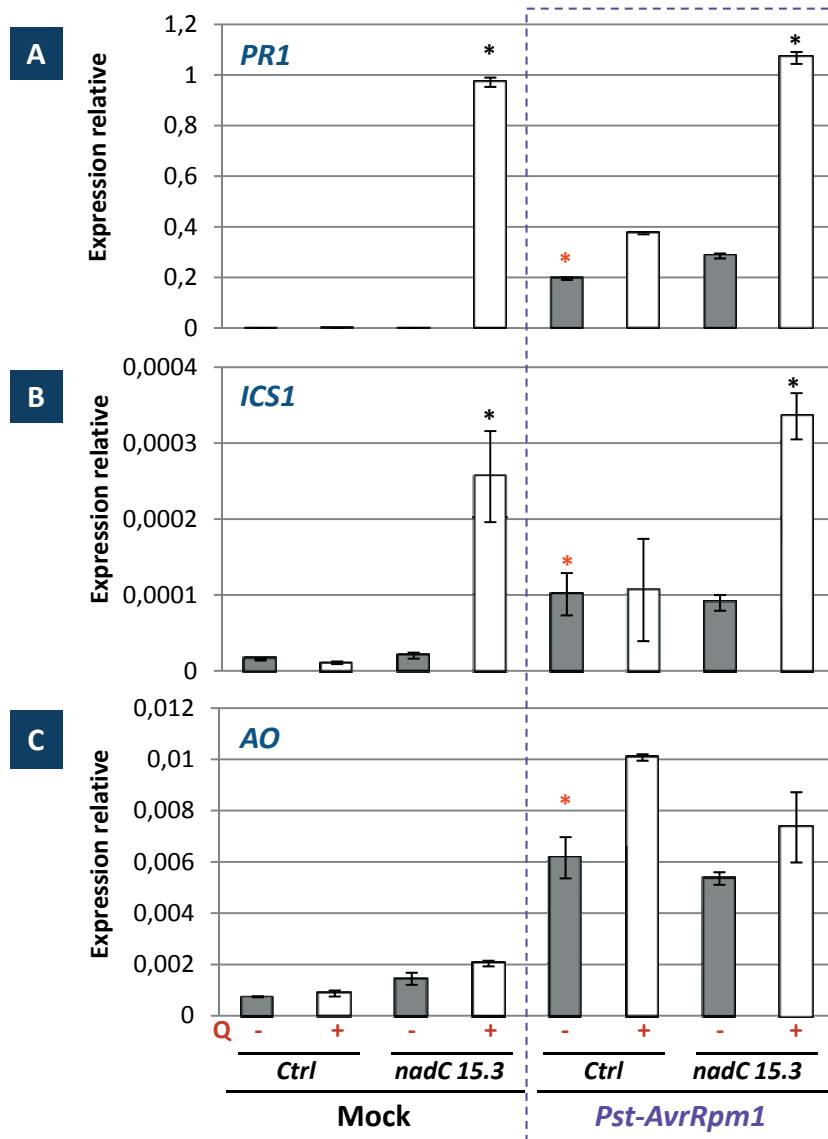
Dans ces mêmes conditions, un dosage du SA par technique HPLC montre une augmentation des pools libres et totaux après infection bactérienne (Figures 65 A et B), comme attendu au cours de l'interaction *Pst-Arabidopsis thaliana* (Glazebrook *et al.*, 2003 ; Heck *et al.*, 2003). Chez les feuilles *nadC* préalablement traitées au quinolinate, les niveaux de SA libres augmentent fortement (plus de 2 fois) par rapport au *Ctrl* (Figure 65 B). Cet enrichissement en SA est en corrélation avec l'importante induction de *PR1* et *ICS1* (Figures 64 A et B). La même tendance est retrouvée pour le pool de SA glucosylé (G-SA), déterminé à partir du pool total auquel on soustrait le pool libre (Figure 65 C).

#### E. Le métabolisme du NAD est perturbé au cours de l'infection

---

La recherche de marqueurs de défense 48 h après infection par *Pst-AvrRpm1* s'est complétée par l'étude du métabolisme du NAD sous un angle transcriptomique (RT-qPCR) et métabolomique. Les antioxydants cellulaires ont été quantifiés par spectrophotométrie et nous avons bénéficié d'une méthode de LCMS récemment développée qui permet de





**Figure 64. Niveaux des transcrits de marqueurs de défense et du gène *AO* de biosynthèse du NAD 48 h après infection avec la bactérie *Pst-AvrRpm1*.** Des feuilles des lignées *Ctrl* et *nadC 15.3* ont été infiltrées avec du quinolinate (Q) puis inoculées 48 h après avec *Pst-AvrRpm1*. Les niveaux de certains transcrits sont mesurés en RT-qPCR à 48 heures post-inoculation (hpi). A : expression du gène *PR1* (*Pathogen Related 1*). B : expression du gène *ICS1* (*Isochorismate synthase 1*). C : expression du gène *AO* codant l'aspartate oxydase. Les résultats, exprimés en expression relative par rapport au gène de référence *ACT2* (*At3g18780*), représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants,  $\pm$  SE de trois mesures. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au contrôle correspondant (*Ctrl*+Q ; *Ctrl* non infecté) (\* $P < 0.05$ , test *t* de Student).

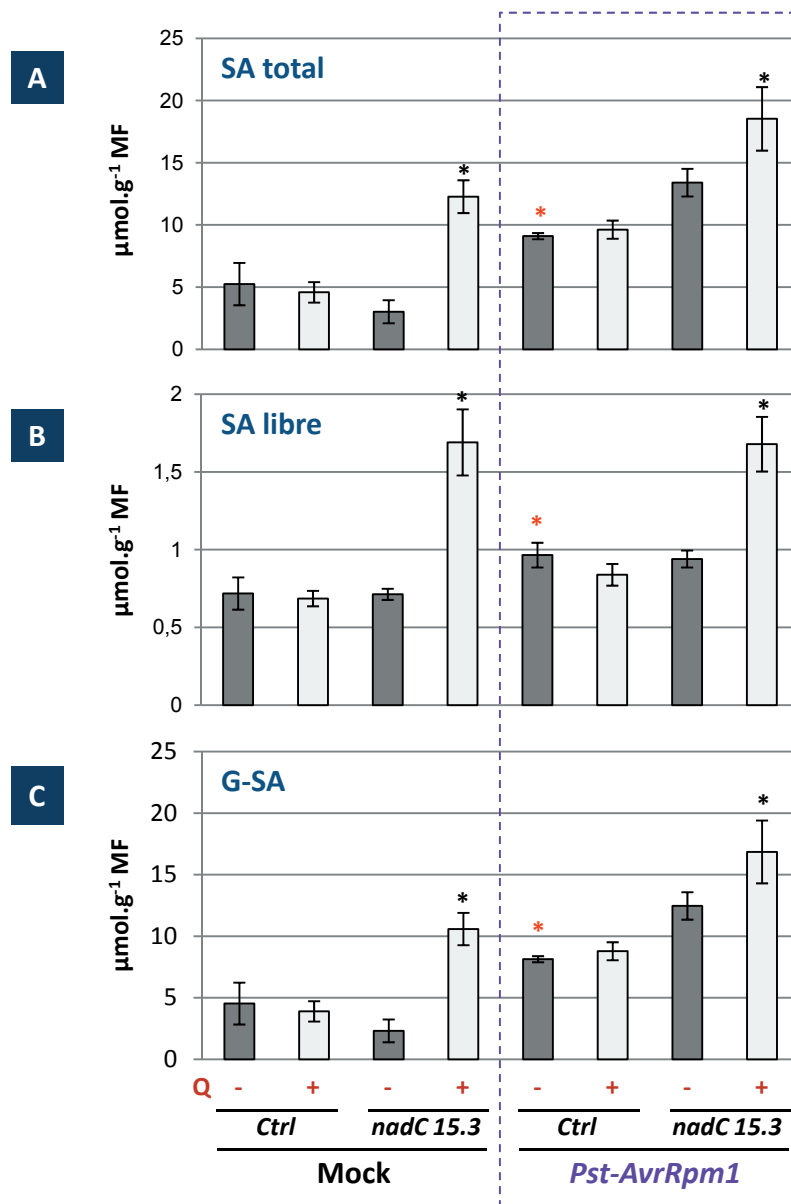
mesurer les niveaux de nucléotides et d'autres cofacteurs. Cette technique fait l'objet de la publication présentée en **Annexe 5** (Guérard *et al.*, 2011). D'après les histogrammes, pour les feuilles *Ctrl* infiltrées et non-infiltrées au quinolinate, ainsi que les feuilles *nadC* non-infiltrées, les niveaux en NAD<sup>+</sup> diminuent légèrement après infection par *Pst-AvrRpm1*. Néanmoins, en conditions de contrôle (mock) et d'infection, le pool de NAD<sup>+</sup> reste nettement augmenté sous traitement quinolinate des lignées *nadC* (**Figure 66 A**).

Comme observé précédemment avec les analyses métabolomiques en GCMS (Chapitre II), l'ajout exogène de quinolinate entraîne l'accumulation de molécules dérivées du NAD, telles que le nicotinamide et le nicotinate (**Figure 66 B et C**). L'analyse du niveau d'expression des gènes de biosynthèse du NAD au cours de l'infection indique une régulation positive du gène *AO* codant l'aspartate oxydase, première enzyme de biosynthèse du NAD (**Figure 47**).

#### F. L'accumulation de SA hors infection n'est pas corrélée à un phénotype de mort cellulaire

---

Au cours de l'infection par *Pst-AvrRpm1*, *Arabidopsis thaliana* reconnaît l'agresseur (interaction gène-pour-gène) et met en place une résistance de type ETI dont les cascades de signalisation (notamment l'induction de *PR1* et l'accumulation de SA) conduisent *in fine* à l'établissement d'une HR avec mort rapide des cellules végétales infectées et restriction de l'agent pathogène au voisinage du site d'infection (Dangl, 1996; Mur *et al.*, 2008). En contexte non pathogène, il a également été proposé qu'une accumulation de SA pouvait induire la mort cellulaire (Yoshimoto, 2010). C'est pourquoi nous avons mesuré des paramètres permettant d'évaluer ce phénomène développemental ultime i) hors infection en infiltrant des feuilles *Ctrl* et *nadC* au quinolinate, et ii) à 48 heures après inoculation de *Pst-AvrRpm1*. Deux techniques ont été adoptées. Une méthode colorimétrique au bleu de trypan qui déclenche une accumulation de coloration bleue dans les cellules mortes (Wäspi *et al.*, 2001) et une méthode conductimétrique de mesure de la fuite d'électrolytes (Pike *et*



**Figure 65. Quantification des différents pools d'acide salicylique (SA) 48 h après infection avec la bactérie *Pst-AvrRpm1*.** A : niveaux totaux de SA. B : pool libre de SA. C : niveaux de SA glucosylé (G-SA). Les résultats indiquent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants,  $\pm$  SE de trois mesures. Les échantillons correspondent aux mêmes conditions présentées en **Figure 64**. Les astérisques représentent une différence statistiquement significative par rapport au contrôle correspondant (*Ctrl+Q* ; *Ctrl non infecté*) (\* P < 0.05, test t de Student).

*al.*, 1998). Hors infection, aucune différence dans l'intensité de la coloration n'a été visualisée entre les tissus des lignées *Ctrl* et *nadC 15.3* traités au quinolinate (**Figure 67 A**). Les mesures préliminaires de la fuite d'électrolytes réalisée à 48 hpi n'indiquent également pas de différences entre les lignées *Ctrl* et *nadC* traitées au non au quinolinate, que ce soit en conditions témoins (mock) ou en conditions d'infection (**Figure 67 B**).

## G. Conclusion et discussion

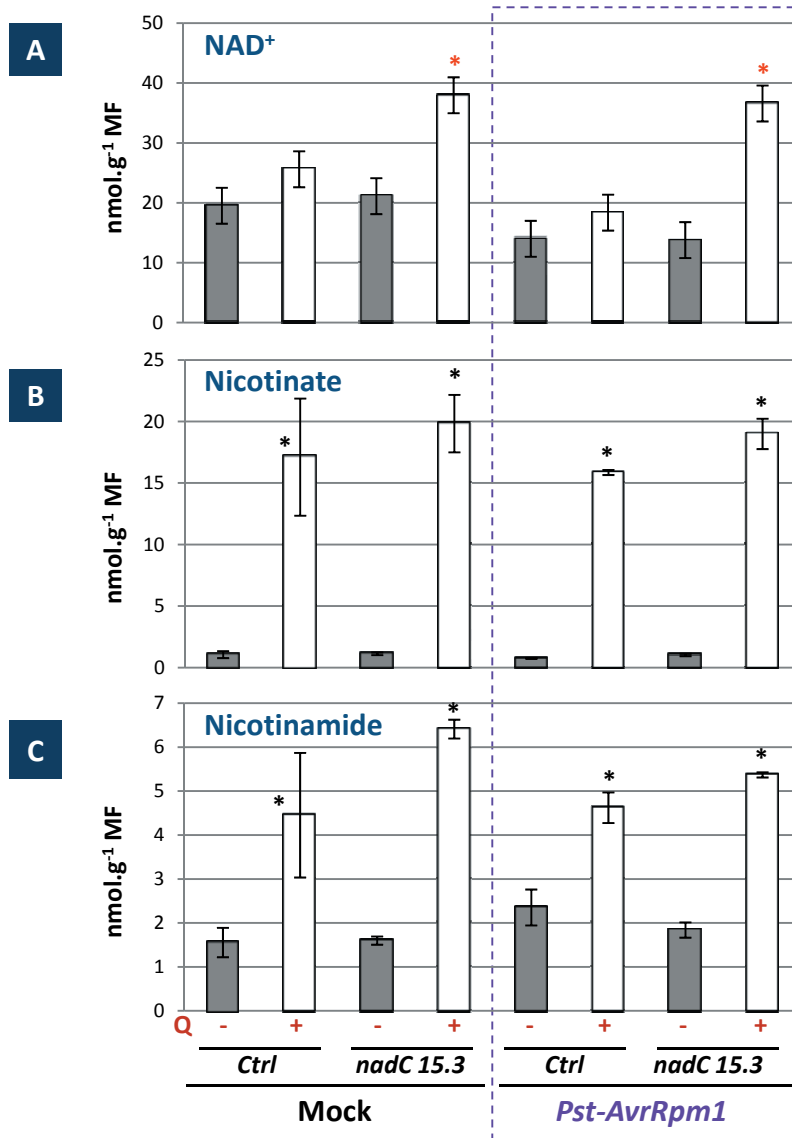
---

### 1. Les niveaux augmentés en NAD stimulent les mécanismes de résistance gène-pour-gène associés au SA

---

Plusieurs travaux scientifiques ont discuté du rôle des nucléotides à pyridine dans la physiologie des stress, mais les résultats observés en termes de tolérance aux contraintes environnementales (comme la résistance aux agents pathogènes) résultaient plus d'effets pléiotropes du NAD que d'effets directs (Dutilleul *et al.*, 2003 ; Ford *et al.*, 2010). Ici, l'approche physiologique par étude phytopathologique indique que l'augmentation spécifique du pool intracellulaire en NAD élicite des mécanismes de défense conduisant à un phénotype de résistance lors de l'interaction incompatible entre *Arabidopsis thaliana* et *Pst-AvrRpm1* (**Figure 62**). En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de diminution de la population des bactéries virulentes *Pst DC3000*, ce qui laisse penser que la défense basale n'est pas affectée par une surproduction de NAD *in planta*.

Le SA est une molécule signal associée à l'induction de réponses de défense contre les agents pathogènes (Loake and Grant, 2007). L'analyse des lignées *nadC* enrichies en NAD montre une biosynthèse endogène du SA exacerbée au niveau transcriptionnel avec l'induction importante du gène *PR1*, marqueur de la voie SA, et du gène de biosynthèse *ICS1* (**Figure 64**) (Wildermuth *et al.*, 2001). Cette activation se traduit par une suraccumulation de pool libres, totaux et glucosylés de SA (**Figure 65**) à 48 hpi, suggérant ainsi un *turnover* accentué dans ces conditions. La **Figure 68** illustre une corrélation forte entre



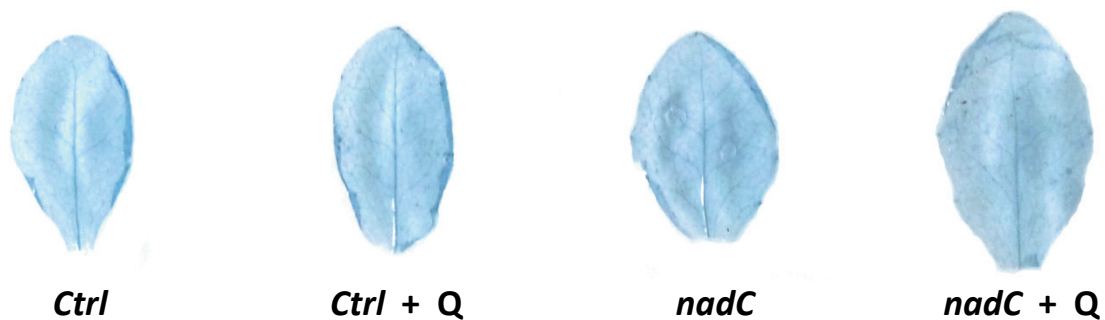
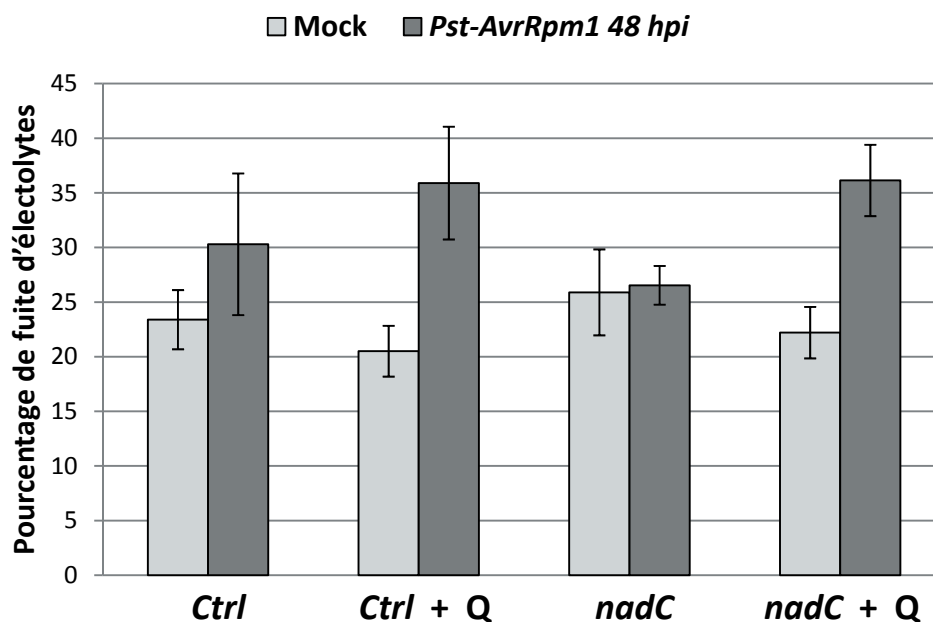
**Figure 66. Mesures des pools de NAD<sup>+</sup> et de ses dérivés (nicotinamide et nicotinate) après infection avec la bactérie *Pst-AvrRpm1* (48 hpi).** A : dosage du NAD<sup>+</sup> ; B et C : quantification par LCMS des pools de nicotinate et de nicotinamide. Les résultats représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants, ± SE de trois mesures. Les échantillons correspondent aux mêmes conditions présentées en **Figure 64**. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au contrôle correspondant (*Ctrl* ; *Ctrl+Q*) (\*P < 0.05, test t de Student).

l'enrichissement en NAD et en SA libre dans les lignées *nadC* en présence de quinolinate, aboutissant à une réduction de la croissance de *Pst-AvrRpm1* à 48 hpi. Ces résultats corroborent d'autres données montrant qu'une application exogène de nucléotides à pyridine entraînait une induction calcium-dépendante de gènes *PR*, avec accumulation de SA et résistance à la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 (*Psm*) (Zhang and Mou, 2009). D'autres études suggèrent que le cADPR dérivé du NAD participe à la signalisation cellulaire, en modulant l'expression des gènes de réponse à l'ABA (Sánchez et al., 2004 ; Wu et al., 1997), ou en induisant des gènes *PAL* et *PR1* (Durner et al., 1998). Dans la présente étude, les profils d'expression génique révèlent la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes liés à la signalisation calcique en réponse au NAD (voir Chapitre III). En revanche, l'expression de *PAL1* est substantiellement diminuée, ce qui peut suggérer un rétrocontrôle négatif de la synthèse du SA issue du chorismate sur la voie dérivée de la Phe (Vlot et al., 2009).

## 2. La résistance bactérienne observée est spécifiquement due à un effet du NAD et non pas de ses dérivés

---

Les néonicotinoïdes sont des analogues structuraux de la nicotine qui accroissent vigueur et tolérance des plantes aux stress, potentialisent la résistance aux microorganismes et agissent comme insecticides (Thielert et al., 2006 ; 2009 ; Ford et al., 2008). Pulvérisés sur des rosettes d'*Arabidopsis thaliana*, ces molécules induisent l'immunité de la plante et miment une réponse transcriptomique proche d'un traitement au SA, se traduisant par l'induction de gènes impliqués dans les stress (a)biotiques ou la SAR, et aboutissant à la résistance à l'agent pathogène de l'oïdium (Ford et al., 2010). Cette résistance pourrait résulter d'une induction de la voie de secours du NAD sous l'action des néonicotinoïdes qui sont des analogues structuraux du nicotinamide, augmentant le pool de NAD/P, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la tolérance aux contraintes environnementales (sécheresse, agents pathogènes) (Thielert et al., 2009). Dans notre étude, la lignée *nadC 15.3* surproduit du NAD en présence de quinolinate au cours de l'infection bactérienne, ce qui élicite les réponses de défense associées au SA et augmente les pools cellulaires de

**A****B**

**Figure 67. Détection de la mort cellulaire hors-infection par coloration au bleu de trypan et à 48 hpi par mesure de la fuite d'électrolytes.** A : coloration au bleu de trypan sur des feuilles *Ctrl* et *nadC* 15.3 infiltrées avec du quinolinate 5 mM pH 6. Environ dix feuilles de chaque condition ont été observées et présentaient les mêmes résultats. B : mesures conductimétriques préliminaires de la fuite d'électrolytes 48 h après inoculation de *Pst-AvrRpm1*. Les résultats exprimés en pourcentage de fuite d'électrolytes correspondent à la moyenne de quatre réplicats techniques d'une seule expérience biologique,  $\pm$  SE de quatre mesures techniques.

nicotinamide et de nicotinate (**Figure 66**). Les feuilles *Ctrl* infiltrées avec du quinolinate présentent aussi un enrichissement en molécules dérivées du NAD. En revanche, ces observations ne s'accompagnent ni d'une surproduction de NAD, ni d'une accumulation de SA, ni d'une croissance contrariée de *Pst-AvrRpm1*. Par conséquent, les dérivés du NAD qui s'accumulent ne sont pas à l'origine de la résistance à *Pst-AvrRpm1*. Au contraire, ce serait très vraisemblablement le NAD lui-même qui ciblerait les réponses de défense végétales. De façon plus spéculative, le traitement au quinolinate pourrait également inhiber l'activité NaPT chez le *Ctrl*, ce qui expliquerait l'accumulation des produits terminaux de la voie de recyclage (nicotinamide et nicotinate), sans augmenter le pool de NAD. Chez les lignées *nadC* en revanche, la surproduction de QPT bactérienne cytosolique permet de métaboliser le quinolinate pour accroître les teneurs en NAD et cet enrichissement pourrait contrecarrer l'effet oxydant du quinolinate (cf oxydation du glutathion). Des analyses de fluxomiques à l'aide de quinolinate marqué apporteraient plus de précisions quant à ces hypothèses.

### 3. L'accumulation de SA hors infection ne permet pas d'expliquer la résistance à *Pst-AvrRpm1*

---

Le SA participe à l'établissement de la mort cellulaire en favorisant l'accumulation de ROS (Lamb and Dixon, 1997). En outre, la caractérisation de mutants *ssi* (*supressor of SA insensitivity of npr1-5*) indique des lésions nécrotiques chez ces lignées mutantes dérégulées dans la transduction du signal SA (Shah *et al.*, 1999 ; 2001; Shirano *et al.*, 2002). Dans nos travaux, ni la coloration au bleu de trypan, ni la mesure de fuite d'électrolytes ne mettent en évidence des différences dans l'intensité de la mort cellulaire entre les lignées *Ctrl* et *nadC* traitées au quinolinate, en contexte non infectieux (**Figure 67**). Chez ces dernières, l'accumulation de SA en réponse à l'enrichissement en NAD aurait pu déclencher un phénomène non contrôlé de mort cellulaire, ce qui aurait pu installer un milieu foliaire HR-like défavorable à la prolifération des bactéries, expliquant alors la résistance lors de l'infection avec *Pst-AvrRpm1*. Il n'en n'est rien. Dans ces conditions, l'effet toxique du quinolinate entraîne un milieu cellulaire plus oxydant qui n'aboutit pourtant pas à la mort des cellules. Quant à la lignée *nadC 15.3* traitée au quinolinate, celle-ci accumule du SA sans



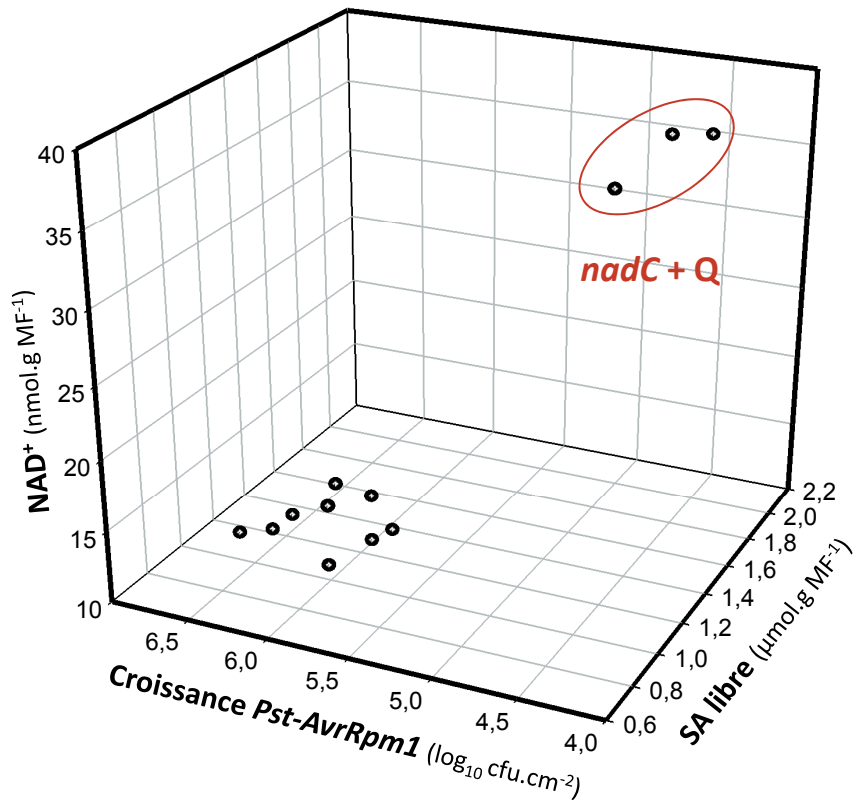


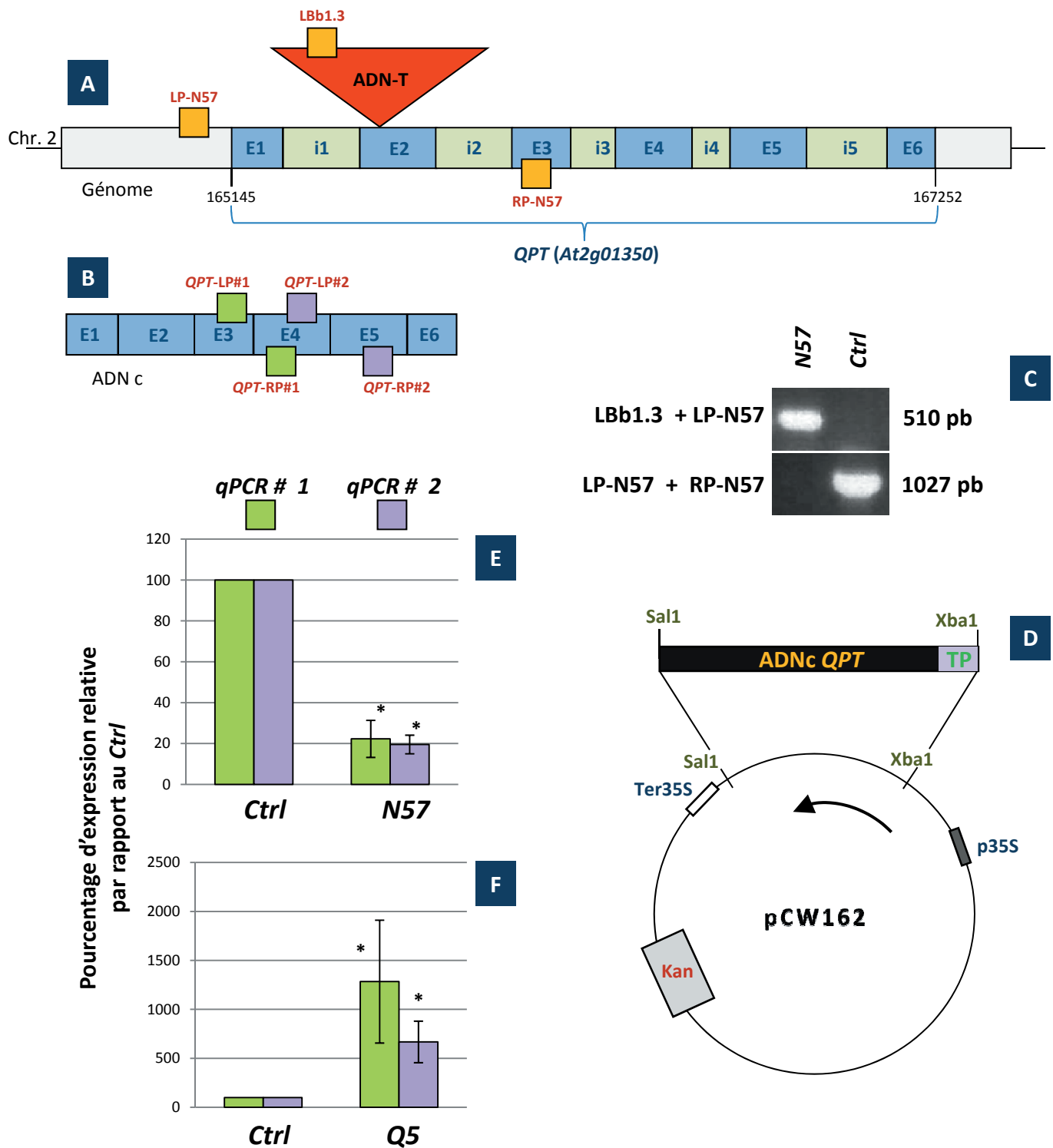
Figure 68. L'augmentation en NAD chez la lignée *nadC 15.3* est corrélée à un enrichissement en SA libre et à une réduction de la croissance de *Pst-AvrRpm1* à 48 hpi. Cette représentation en trois dimensions reprend les résultats obtenus dans les figures précédentes. SA : acide salicylique.

augmentation de la mort des cellules. Les résultats obtenus à 48 hpi indiquent la même absence de différentiel entre les lignées *Ctrl* et *nadC*.



## CHAPITRE V

**Caractérisations moléculaire et phénotypique de lignées  
mutantes ADN-T et surexprimeur constitutivement affectées  
dans la production de la QPT d'*Arabidopsis thaliana***



**Figure 69. Caractérisation moléculaire de lignées mutantes et surexpresser du gène *QPT* d'*Arabidopsis thaliana*.** A : localisation du transgène sur la séquence codante du gène *QPT* (*At2g01350*) chez la lignée *N57* (SALK\_075260). E : exons ; i : introns. Les carrés oranges représentent la position des amorces utilisées pour le génotypage par PCR (C). B : ADNc correspondant au gène *QPT*. Les carrés verts et violets correspondent aux amorces utilisées pour la quantification des transcrits en RT-qPCR (vert, qPCR# 1 et violet, qPCR # 2). C : génotypage du mutant homozygote *N57*. D : construction utilisée pour l'obtention de plantes transgéniques surexprimant l'ADNc du gène *QPT*. TP : peptide de transit. E et F : quantification relative des messagers *QPT* par référence à *ACT2* (*At3g18780*). Les résultats correspondent à la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants, exprimés en pourcentage d'expression relative par rapport au *Ctrl*,  $\pm$  SE de trois mesures.

## V. Caractérisations moléculaire et phénotypique de lignées mutantes ADN-T et surexprimeur constitutivement affectées dans la production de la QPT d'*Arabidopsis thaliana*

---

### A. Buts de l'étude

---

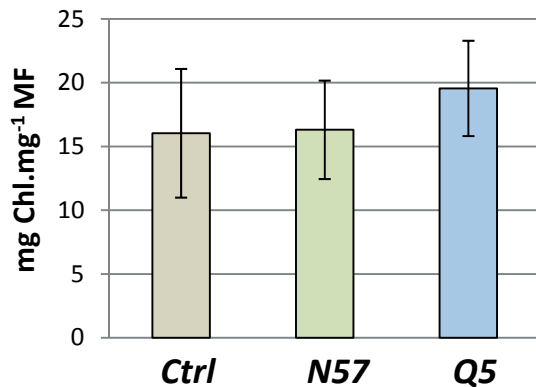
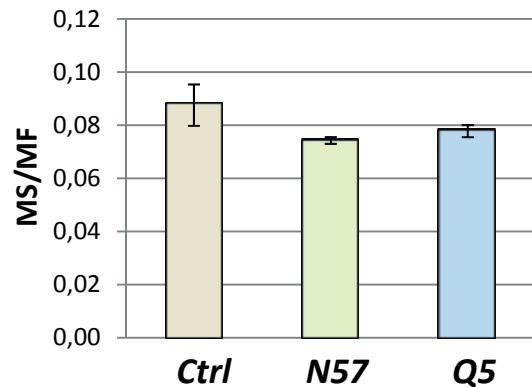
Les résultats obtenus dans les précédents chapitres confirment le rôle important exercé par la QPT dans le contrôle des teneurs en nucléotides à pyridine chez les végétaux. Le système inductible *nadC* est un puissant outil pour tester une surproduction inductible de NAD chez *Arabidopsis thaliana*, sans changer pour autant l'état rédox du pool. La nécessité de fournir du quinolinate aux cellules, et donc de traiter chimiquement les plantes, constitue néanmoins une limite à ce système, le rendant contraignant pour certaines approches physiologiques (mesure de la photosynthèse, carence azotée, etc.).

Pour pallier à ces aléas et pouvoir mieux cerner les mécanismes régulateurs du métabolisme du NAD, deux stratégies complémentaires ont été adoptées. Les expérimentations conduites dans ce chapitre ont pour objet l'obtention de plantes dérégulées dans la biosynthèse du NAD, en modifiant de façon constitutive la production de QPT et en conséquence les niveaux de NAD chez *Arabidopsis thaliana*. Pour cela, deux lignées altérées de façon opposée dans l'expression du gène *QPT* ont été caractérisées : une lignée d'insertion ADN-T (ADN de transfert) mutée pour l'expression du gène d'intérêt et une lignée qui surexprime l'ADNc de la QPT d'*Arabidopsis thaliana* dans son compartiment d'adressage naturel (le chloroplaste).

### B. Obtention de plantes mutantes d'*Arabidopsis thaliana* homozygotes pour l'insertion de l'ADN-T dans le gène *QPT*

---

La lignée *N575260* (SALK\_075260) mutante ADN-T portant l'insertion dans la séquence codante du gène de la quinolinate phosphoribosyltransférase (*QPT*, numéro d'accèsion *At2g01350*), a été obtenue dans un fond génétique Columbia (Col0), à partir de la collection du

**A****B****C**

**Figure 70. Phénotype morphologique des lignées N57 et Q5.** A : plantes d'*Arabidopsis thaliana* cultivées pendant deux semaines en *Jours Courts* (photopériode 8 h, voir Matériels et Méthodes) ; B : mesure des teneurs en chlorophylles totales chez les plantes *Ctrl* (barres beiges), le mutant *N57* (barres vertes) et le surexprimeur *Q5* (barres bleues). C : rapport Masse sèche/Masse fraîche (MS/MF) des lignées *Ctrl*, *N57* et *Q5*. Les résultats correspondent à une expérience,  $\pm$  SE de trois mesures techniques.

Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, San Diego, USA (Alonso *et al.*, 2003). Le transgène de la lignée SALK\_075260 est inséré dans le deuxième exon du gène *At2g01350* (**Figure 69 A**).

Le mutant homozygote pour cette insertion ADN-T, noté *N57*, a été identifié par criblage PCR sur ADN génomique extrait de plantules âgées de 15 jours (**Figure 69 C**). La présence de l'ADN-T a été vérifiée en utilisant les couples d'amorces LP-N57/LBb1.3 (allèle muté, bord gauche de l'ADN-T) (**Figure 40**), l'amorce LBb1.3 s'hybridant sur l'ADN-T et l'amorce LP-N57 spécifique au gène *QPT*. D'après la **Figure 69 C**, seule la lignée *N57* présente une bande d'amplification de 510 pb confirmant l'insertion de l'ADN-T dans son génome. Le couple LP-N57/RP-N57 (allèle sauvage) permet quant à lui de tester l'intégrité du gène endogène *At2g01350*. Avec ce couple d'amorces, une bande de 1027 pb est observée uniquement chez les plantes *Ctrl*. Ce produit d'amplification est absent chez le mutant *N57* confirmant alors son état homozygote (**Figure 69 C**).

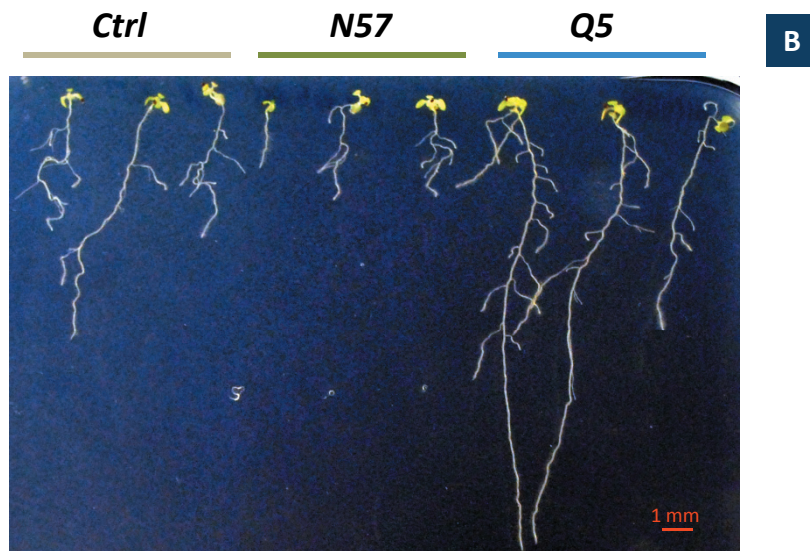
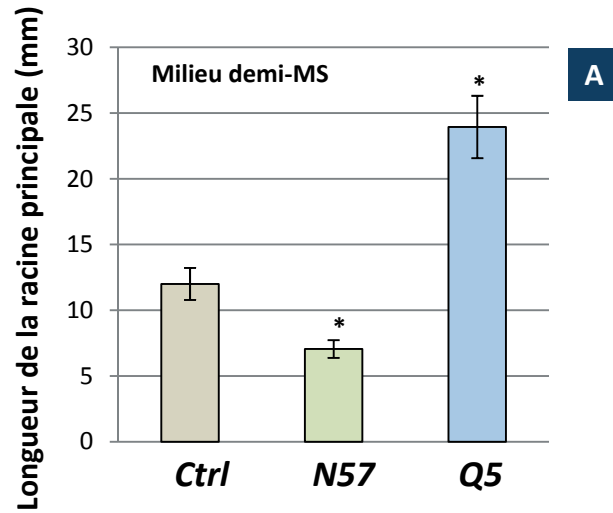
L'utilisation de la technique de RT-qPCR a permis de mesurer l'expression du gène *QPT*. Pour cela, deux couples d'amorces spécifiques ont été conçues à partir de la séquence de l'ADNc correspondant (**Figure 69 B**). Une méthode de quantification relative a été appliquée en utilisant le gène *ACT2* (*At3g18780*) comme gène de référence. Les résultats, exprimés en pourcentage d'expression relative par rapport au *Ctrl*, indiquent une diminution drastique du niveau des messagers *QPT* chez le mutant *N57* par rapport au *Ctrl* (**Figure 69 E**). L'expression du gène *QPT* n'est cependant pas nulle, puisque nos données révèlent un niveau résiduel de l'ordre de 20 % chez le mutant *N57*, et ce pour les deux couples d'amorces qui recouvrent différentes zones de l'ADNc du gène *QPT* (**Figure 69 B**).

### C. Surexpression constitutive de l'ADNc codant la QPT d'*Arabidopsis thaliana*

---

La seconde approche adoptée consiste à surexprimer de façon constitutive l'ADNc du gène *QPT* d'*Arabidopsis thaliana* dans le chloroplaste, son compartiment naturel d'adressage. Nous avons réalisé un sous-clonage de l'ADNc dans le vecteur pCW162 utilisé dans les précédents chapitres (**Figure 69 D**). Cette construction a ensuite servi à la transformation par Agrobactéries de plantes Columbia. Les lignées transgéniques indépendantes obtenues ont été sélectionnées sur





**Figure 71. Altération de la croissance racinaire chez les lignées *N57* et *Q5*.** A : Mesure de la longueur de la racine principale deux semaines après semis, sur cinq échantillons biologiques (cinq boîtes de trois échantillons par génotype) indépendants de plantes *Ctrl* (barres ocre), du mutant *N57* (barres vertes) et du surexprimeur *Q5* (barres bleues),  $\pm$  SE de cinq mesures. B : observation de la croissance sur boîtes verticales en milieu demi-MS. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student).

plusieurs générations pour leur résistance à la kanamycine. Sur les transformants âgés de 15 jours issus de la génération T5 (5 régimes de sélection), notés de *Q1* à *Q5*, une mesure du niveau de transcrits spécifiques *QPT* a été effectuée et indique que les surexprimeurs *35S::QPT* présentent tous des niveaux de messagers *QPT* augmentés (**Annexe 4**). La lignée *Q5* (**Figure 69 F**) a été retenue pour la suite de notre étude car présentant le plus haut niveau d'expression du gène *QPT* (20 fois plus).

#### D. La croissance est altérée chez les lignées *N57* et *Q5*

---

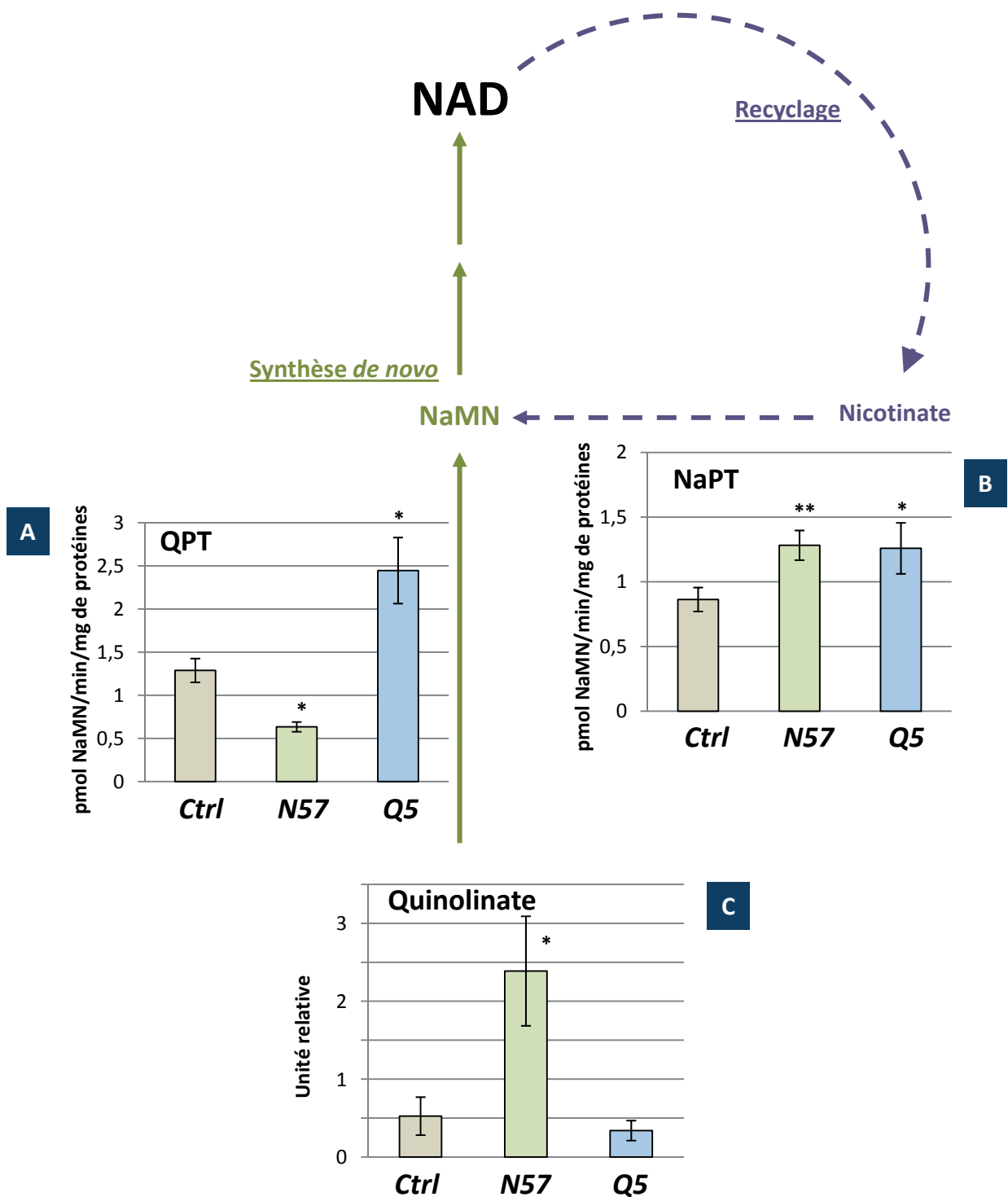
Le phénotype morphologique du mutant *N57* se caractérise par une forte altération développementale (**Figure 70 A**). Les plantes *N57* présentent un retard de croissance. En revanche, la teneur en chlorophylles dégradées (phéophytines) ainsi que le rapport masse fraîche/masse sèche ne semblent pas altérés (**Figures 70 B et C**). Le surexporteur *Q5* ne se distingue pas morphologiquement de la lignée *Ctrl* et ses teneurs en eau et phéophytines sont comparables (**Figures 70 A, B et C**).

L'analyse de la croissance racinaire s'est effectuée sur boîtes verticales de milieu minimum demi-MS (Murashige & Skoog). Deux semaines après semis, un différentiel est observé entre les trois lignées (**Figure 71 A et B**). Le mutant *N57* se caractérise par une croissance contrariée de la racine principale par rapport au *Ctrl* avec une diminution de la longueur de plus de 40 % (12 mm vs 7.3). A l'inverse, les racines principales du surexporteur *Q5* sont deux fois plus longues que celles du *Ctrl*. Il semblerait également que le développement de racines latérales soit favorisé chez *Q5* par rapport au *Ctrl* (**Figure 71 B**). Chez le mutant *N57*, les racines latérales se retrouvent au contraire moins développées.

#### E. Dérégulation de la production de QPT chez les plantes mutantes

---

La vérification de l'expression du gène *QPT* s'est complétée par un dosage d'activités PRTases chez les lignées *Ctrl*, *N57* et *Q5*, afin de savoir si les variations transcriptionnelles



**Figure 72. Dérégulation du métabolisme du NaMN.** A : activité *in vitro* QPT ; B : activité NaPT, et C : teneurs relatives en quinolinate chez les plantes *Ctrl* (barres beiges), le mutant *N57* (barres vertes) et le surexprimeur *Q5* (barres bleues). La mesure des activités a été réalisée par quantification du NaMN formé au cours des réactions. La quantification relative des niveaux de quinolinate a été réalisée en GCMS (voir Matériels et Méthodes). Les résultats représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants,  $\pm$  SE de trois mesures (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , test *t* de Student).

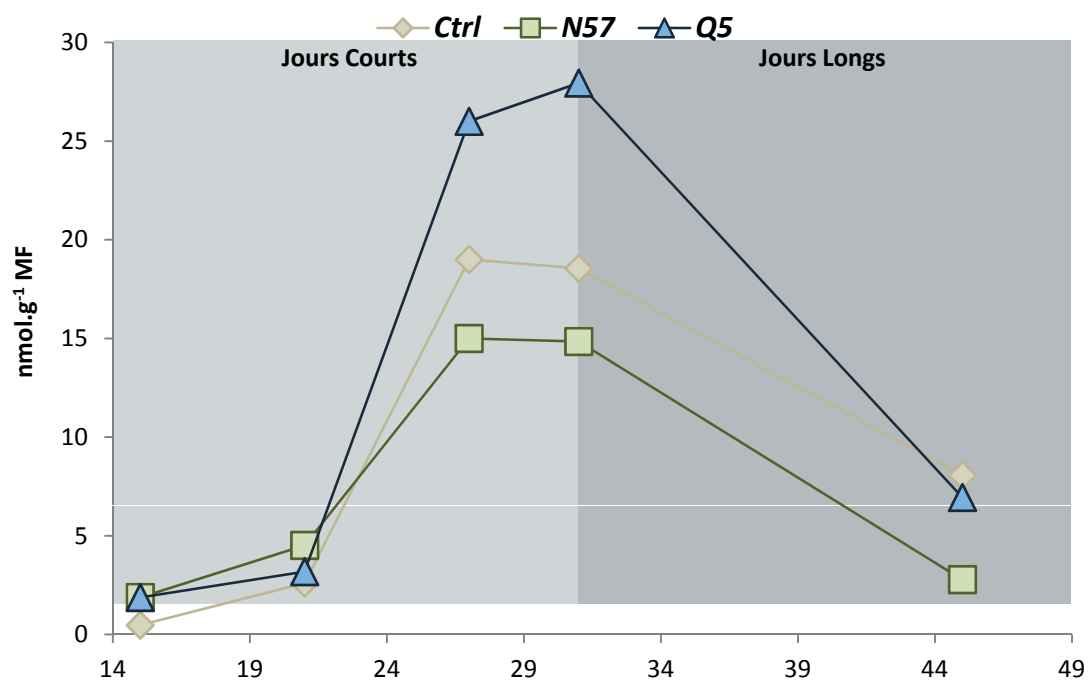
observées étaient corrélées à une modification de l'activité de l'enzyme. Comme attendu, l'activité extractible *in vitro* de la QPT suit la même tendance que le niveau d'expression du gène correspondant (**Figure 72 A**). Chez le mutant *N57*, l'activité QPT est diminuée de l'ordre de 50 % par rapport aux plantes *Ctrl*, alors qu'elle est multipliée par 2.4 environ chez le surexprimeur *Q5* (**Figure 72 A**). En parallèle, l'activité totale extractible NaPT a été mesurée (**Figure 72 B**). Celle-ci augmente sensiblement d'environ 50 %, à la fois chez le mutant *N57* et le surexprimeur *Q5* par rapport au *Ctrl*.

La diminution de la production de QPT chez le mutant *N57* nous a poussés à regarder de plus près le métabolisme du quinolinate. Une analyse GCMS permettant de mesurer le pool de quinolinate confirme l'effet délétère de la mutation sur cette étape enzymatique. Chez les plantes *N57*, les niveaux de quinolinate sont multipliés par cinq environ par rapport au *Ctrl* (**Figure 72 C**).

#### F. La production de QPT influence les niveaux stationnaires de nucléotides à pyridine

---

En dérégulant de façon constitutive la production de QPT, nous visions à obtenir des plantes constitutivement altérées dans les niveaux stationnaires et les flux de synthèse de nucléotides à pyridine. Des éléments provenant de la littérature montrent une dynamique des teneurs en  $\text{NAD}^+$  tout au long de la croissance des plantes (Queval et Noctor, 2007 ; Wang et Pichersky, 2007) (**Figure 26**). Au cours de la croissance des plantes, les niveaux de  $\text{NAD}^+$  augmentent puis se stabilisent au bout de 25 à 30 jours courts (photopériode 8 h lumière) selon le stade de développement considéré (**Figure 73**). Une analyse du pool d'antioxydants cellulaires libres a été réalisée sur des échantillons foliaires provenant de plantes cultivées pendant 31 jours en chambre de culture *Jours Courts*, afin de se placer dans des conditions où le pool de NAD présente le plus fort différentiel entre les lignées étudiées. Le dosage des teneurs en NAD(H) montre une tendance à la baisse chez le mutant *N57* de l'ordre de 15 % par rapport au *Ctrl* (**Figure 74 A**). Cette diminution des teneurs en NAD chez *N57* s'accompagne d'une légère oxydation du pool avec un rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  qui augmente (8.50 chez le *Ctrl* contre 10.35 chez *N57*). Ce phénomène est également observé pour le pool de NADP(H) avec une légère baisse chez le mutant *N57* associée à un rapport  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  supérieur (**Figure 74 B**). Ainsi, en diminuant le



**Figure 73. Évolution des niveaux de NAD<sup>+</sup> foliaires au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*.** Les différentes lignées ont été mises à germer puis placées en chambre de culture *Jours Courts* (fond gris clair, photopériode 8 h lumière/16 h obscurité). 31 jours après semis, les plantes sont placées en chambre de culture *Jours Longs* (fond gris foncé, photopériode 16h lumière/8 h obscurité). Les résultats sont exprimés en nmol de NAD<sup>+</sup>.g<sup>-1</sup> MF et correspondent à une seule expérience biologique.

niveau de QPT endogène, on obtient des plantes ayant légèrement moins de NAD/P(H) dont l'état rédox est plus oxydé.

Concernant le surexprimeur *Q5*, celui-ci présente un enrichissement substantiel en NAD(H) d'environ 35 % par rapport au *Ctrl* (**Figure 74 A**), ainsi qu'une légère hausse des teneurs en NADP(H) (**Figure 74 B**). La balance rédox des nucléotides à pyridine ne présente cependant pas de variation marquée en comparaison avec le *Ctrl* : 8.50 vs 8.79 pour le NAD(H) et 2.52 vs 2.11 pour le NADP(H). En faisant augmenter le niveau de QPT endogène, on peut ainsi obtenir des plantes ayant de façon constitutive plus de NAD sans pour autant modifier son état rédox.

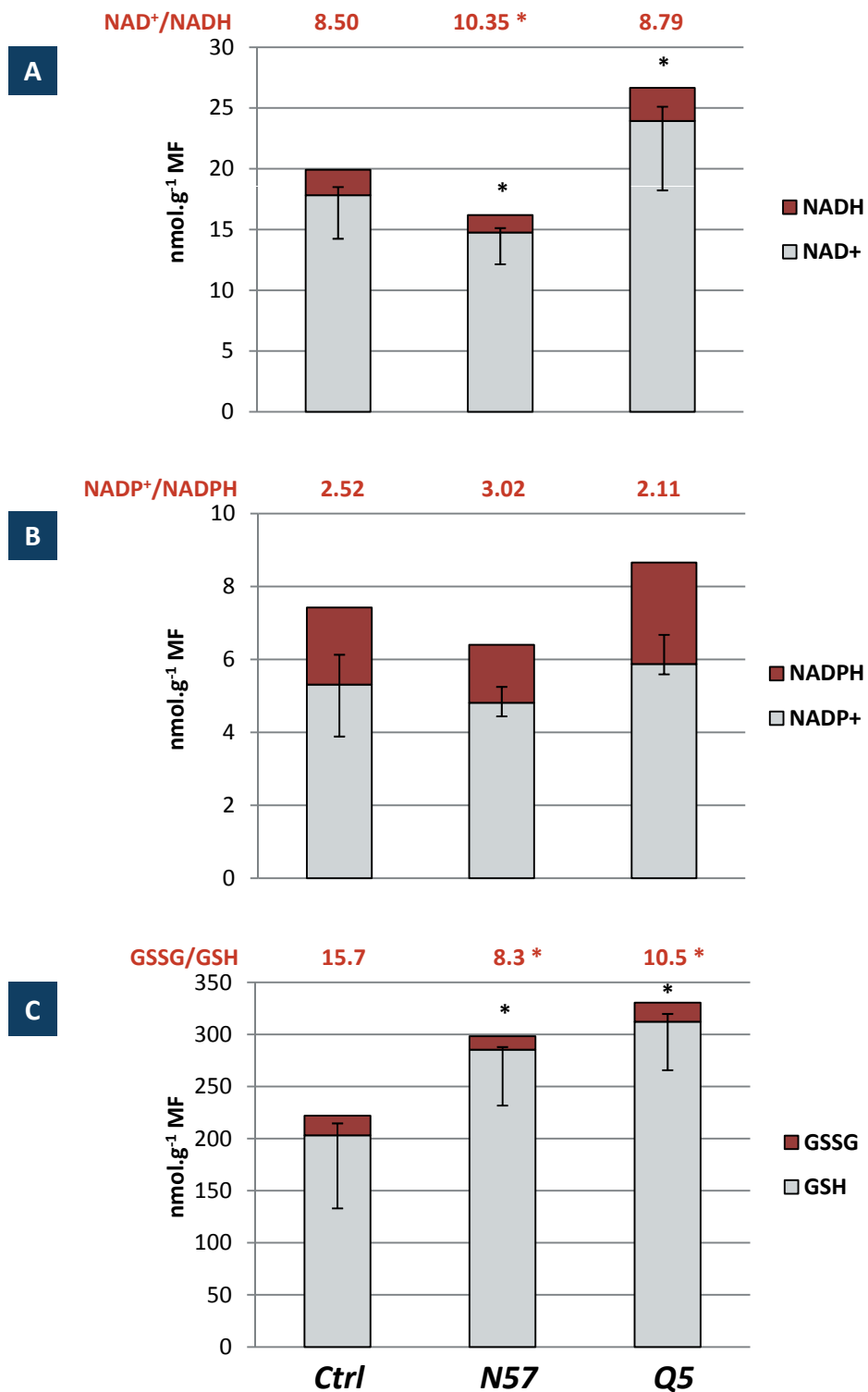
Puisque la synthèse du glutathion est couplée à l'utilisation du NADPH (Foyer et Noctor, 2011) (**Figure 23 A**), nous avons quantifié les niveaux intracellulaires de GSH et GSSG chez les différentes lignées. La mesure des teneurs en GSH et GSSG indique une augmentation du pool total chez le mutant *N57* et le surexprimeur *Q5*, de 34 et 49 % respectivement (**Figure 74 C**). Cette augmentation est associée à une légère réduction du glutathion puisque le rapport GSSG/GSH, qui est de 15.7 chez le *Ctrl*, descend à 10.5 chez *Q5* et encore plus bas chez *N57* (8.3, **Figure 74 C**). Il semblerait que l'oxydation observée du pool de NAD/P chez le mutant *N57* (**Figure 74 B**) soit compensée, ou du moins associée, à une réduction plus importante du glutathion.

Les analyses qui suivent, sauf exception, ont été réalisées sur des plantes cultivées pendant 31 jours sous une photopériode de 8 h de lumière/ 16 h d'obscurité, de manière à se placer dans des conditions où le pool de nucléotides à pyridine présente la plus grande différence entre les lignées étudiées.

### G. Analyses de l'expression des gènes du métabolisme du NAD

---

L'analyse des lignées *N57* et *Q5* dérégulées dans la production de QPT a été étendue à une quantification par RT-qPCR du niveau de messagers des gènes codant les enzymes de biosynthèse, recyclage et utilisation du NAD. Seuls les gènes présentant des régulations significatives sont présentés (**Figure 75**). Les résultats obtenus révèlent une induction des gènes de biosynthèse



**Figure 74. Mesures des pools libres intracellulaires foliaires de nucléotides à pyridine et de glutathion.** A : Pool de NAD<sup>+</sup> et NADH ; B : NADP<sup>+</sup> et NADPH ; et C : glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG). Les résultats représentent la moyenne de cinq échantillons indépendants, ± SE de cinq mesures, chez les plantes *Ctrl* (barres beiges), le mutant *N57* (barres vertes) et le surexprimeur *Q5* (barres bleues). En rouge figurent les rapports rédox du NAD, NADP et du glutathion. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* (\* P < 0.05, test t de Student).

codant l'AO et la NADS chez le mutant *N57* et le surexprimeur *Q5*, ainsi que le gène *PARP2*, activé au niveau transcriptionnel chez les plantes *N57*. Quoi qu'il en soit, les variations observées restent modestes.

## H. Conclusion et discussion

---

La manipulation de la biosynthèse du NAD a été poursuivie au niveau de l'étape réactionnelle QPT par une approche de dérégulation constitutive de la production de NAD par des stratégies de sous- et sur-expression du gène endogène *At2g01350* de la QPT chez *Arabidopsis thaliana*.

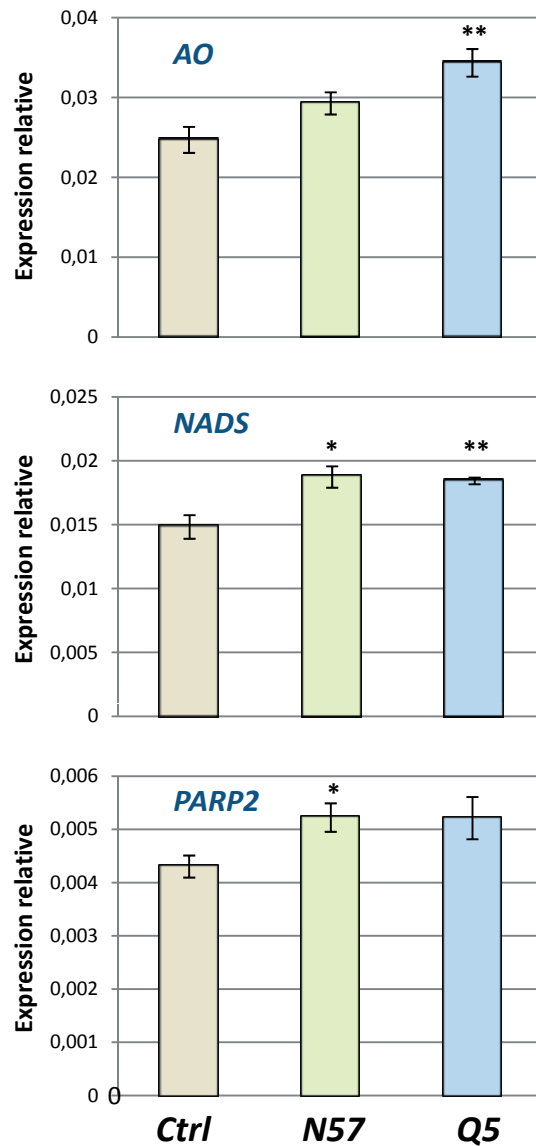
### 1. Le mutant *N57* homozygote pour le gène *QPT* est non létal

---

Les travaux réalisés dans ce chapitre démontrent qu'il est possible d'obtenir chez *Arabidopsis thaliana* un mutant homozygote pour l'insertion d'un ADN-T dans la séquence codante du gène *QPT*. La caractérisation de la lignée SALK *N575260* indique que la mutation par insertion d'ADN-T est délétère pour le gène (**Figure 69 C**), ce qui s'accompagne de niveaux réduits (mais non nuls) de transcrits spécifiques *QPT* (**Figure 69 E**). L'activité QPT chez le mutant est également diminuée de façon significative et non négligeable (**Figure 72 A**), engendrant consécutivement une suraccumulation de quinolinate (**Figure 72 C**).

*Katoh et al. (2006)* ont montré chez des mutants d'insertion de transposons que l'état homozygote pour les trois premiers gènes codant les enzymes de la voie de synthèse du NAD (*i.e.* AO, QS et QPT) entraînait une létalité embryonnaire chez *Arabidopsis thaliana*. Par ailleurs, ces auteurs ne rapportaient pas de phénotype sur les mutants à l'état hétérozygote. Nos observations diffèrent fortement des résultats de ces auteurs. Nous avons obtenu le mutant *N57* homozygote pour le gène *QPT* qui est viable, malgré un phénotype développemental très marqué. Cette non-létalité peut s'expliquer en partie par un niveau résiduel de transcrits *QPT* chez *N57*, associé à une activité enzymatique non nulle. Vraisemblablement, la mutation par insertion d'ADN-T limiterait





**Figure 75. Mesure des niveaux de transcrits de gènes du métabolisme du NAD.** A : expression du gène *AO* codant l'aspartate oxydase ; B : expression du gène *NADS* codant la NAD synthétase, et C : expression du gène *PARP2* codant la polyADP-ribose polymérase 2. Les résultats, exprimés en expression relative par rapport au gène de référence *ACT2* (*At3g18780*), représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants,  $\pm$  SE de trois mesures, chez les plantes *Ctrl* (barres beiges), le mutant *N57* (barres vertes) et le surexprimeur *Q5* (barres bleues). Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student).

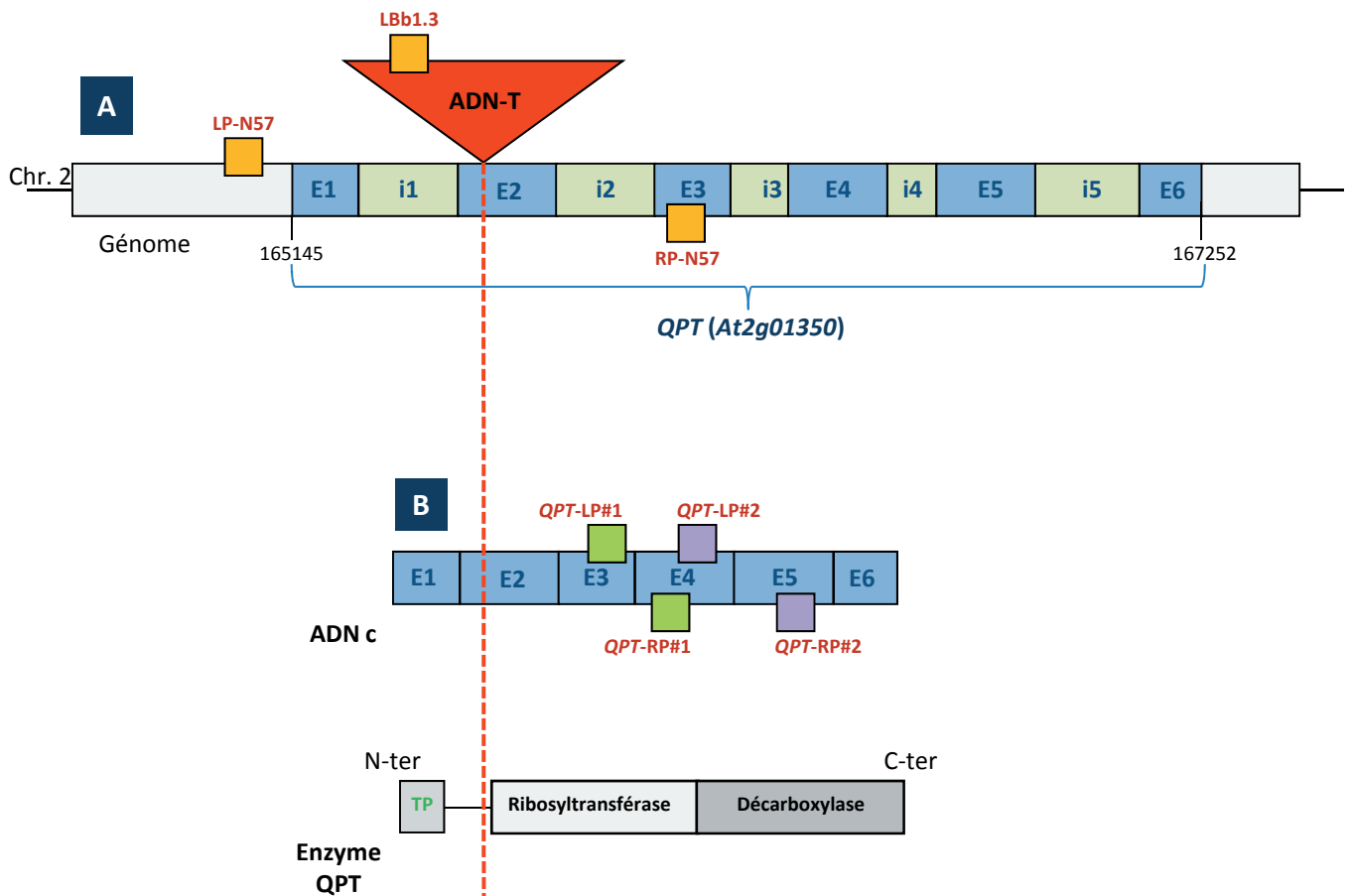
fortement l'expression des transcrits et pourrait aussi déstabiliser les messagers QPT. Une version probablement tronquée des transcrits semble produire cependant une protéine fonctionnelle, contribuant ainsi à synthétiser le NaMN indispensable à la biosynthèse *de novo* de NAD (**Figure 47**). En effet, l'insertion de l'ADN-T se situe en tout début du domaine ribosyltransférase de la QPT (**Figure 76**). Il en résulte que les domaines ribosyltransférase N-terminal et décarboxylase C-terminal ne sont pas interrompus par l'insertion de l'ADN-T (**Figure 76**). Cette insertion aurait pour seul effet d'abaisser drastiquement le niveau d'expression du gène d'environ 80 %.

On pourrait aussi imaginer que le pool de quinolinate augmentant, une autre protéine de plus faible affinité pour le quinolinate puisse convertir ce substrat en NaMN. Ceci renforcerait la viabilité des plantes. C'est ce que nous cherchons à savoir en clonant et surproduisant les deux isoformes de NaPT d'*Arabidopsis thaliana* afin de déterminer leur affinité pour le quinolinate. Il se peut que les NaPT qui utilisent le nicotinate comme substrat, molécule structurellement proche du quinolinate, puissent aussi utiliser le quinolinate. Cependant chez l'Homme, il est à noter que les NaPT ne sont pas capables de métaboliser le quinolinate (Liu *et al.* 2007).

## 2. La QPT exerce un contrôle clé sur l'homéostasie rédox et du NAD

---

La caractérisation des lignées *N57* et *Q5* témoigne du rôle pivot qu'occupe la QPT dans l'homéostasie du NAD. Alors qu'une surproduction inductible de NAD chez les lignées *nadC* résultait en une très forte augmentation du pool de NAD<sup>+</sup> (voir Chapitre I), la dérégulation de la production de QPT joue autant sur les niveaux de nucléotides à pyridine que sur la balance rédox de ces molécules. Ceci est vrai pour le mutant *N57* qui présente un pool de NAD/P(H) diminué, mais aussi plus oxydé (**Figure 74 A**). Le surexpresser *Q5* quant à lui se caractérise par un enrichissement en NAD de l'ordre de 35 % en réponse à une augmentation de plus de deux fois de l'activité QPT. La dérégulation des niveaux de QPT est corrélée à une régulation transcriptionnelle des gènes de la voie de synthèse du NAD. Cette régulation semble significative pour les étapes codées par l'AO et la NADS. Ces mêmes étapes enzymatiques sont déjà connues pour être induites au niveau transcriptionnel dans différentes conditions environnementales (Hager *et al.*, 2010 ; <https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>). Il est intéressant de souligner que la stimulation



**Figure 76. Du gène à la protéine : localisation de l'insertion ADN-T.** L'insertion de l'ADN-T est placée en début de l'exon 2 du gène *At2g01350* de la QPT, dans une zone qui est en amont de la séquence codant les sites catalytiques ribosyltransférase et décarboxylase de la QPT.

de l'activité NaPT chez le mutant et le surexprimeur n'est pas associée à une régulation transcriptionnelle des gènes codant les deux isoformes chez *Arabidopsis thaliana*. La littérature rapporte l'existence d'un mutant caractérisé par une légère altération de la biosynthèse du NAD (Schippers *et al.*, 2008). Il s'agit du mutant *old5* d'*Arabidopsis thaliana* qui est affecté dans l'activité d'une sous-unité Cys désulfurase non catalytique de la QS. De façon surprenante, les pools de nucléotides à pyridine sont augmentés chez le mutant *old5*. Les auteurs attribuent cet enrichissement à une stimulation du recyclage du NAD. Dans notre travail, la caractérisation biochimique du mutant *N57* indique une stimulation de l'activité NaPT, sans corrélation avec des teneurs supérieures en NAD/P(H). Au contraire, le pool de nucléotides à pyridine se caractérise par une légère déplétion. A l'instar du mutant *old5*, le mutant *N57* est stimulé dans le recyclage avec une activité NaPT exacerbée. En revanche *N57* est affecté dans l'activité QPT de presque 50 %. On peut imaginer que chez le mutant *N57* la stimulation du recyclage par les NaPTs viendrait d'un besoin de synthèse de NAD pour "compenser" une diminution du flux de synthèse *de novo*. Chez le surexprimeur *Q5*, la stimulation du recyclage par les NaPTs viendrait plutôt de la nécessité de recycler les produits d'utilisation du NAD.

De surcroît, on remarque une augmentation du pool total de glutathion chez les lignées *N57* et *Q5* dérégulées de façon opposée dans la production de QPT (**Figure 74 C**). Sous un aspect purement rédox, cette augmentation pourrait s'expliquer chez le surexprimeur *Q5* par une exacerbation de la synthèse de glutathion étroitement liée au pool de NADPH, augmenté chez le *Q5*. La synthèse de glutathion à partir de la cystéine est réalisée par deux enzymes ( $\gamma$ -glutamyl-cystéine synthétase ou  $\gamma$ -ECS, EC 6.3.2.2 et glutathion synthétase ou GSH-S, EC 6.3.2.3) (Mullineaux et Rausch, 2005). Non seulement ce tripeptide est indispensable au maintien de l'état de réduction cellulaire, mais il sert également de cofacteur pour un certain nombre d'enzymes. Son état de réduction cytosolique est maintenu à un niveau élevé par la glutathion réductase (GR, EC 1.8.1.5) grâce au pouvoir réducteur du NADPH (Meyer *et al.*, 2007). C'est généralement en conditions de stress oxydant que la synthèse de glutathion est stimulée, soit en raison d'une augmentation de la concentration en substrats comme la cystéine, soit par les activités de la  $\gamma$ -ECS et/ou de la GSH-S exacerbées (May et Leaver, 1993 ; Foyer et Noctor, 2005). Ainsi, afin de mieux comprendre d'où provient l'enrichissement en glutathion observé chez les lignées *N57* et *Q5*, il serait pertinent de tester chez ces plantes d'une part les niveaux de l'ensemble des thiols cellulaires, notamment ceux de la cystéine, et d'autre part l'activité des enzymes qui exercent un



coefficient de contrôle important sur la synthèse de GSH, c'est-à-dire l'adénosine phosphosulfate réductase (EC 1.8.4.9), la  $\gamma$ -ECS et la GSH-S.

Cette augmentation des niveaux totaux de glutathion est associée à une réduction plus importante du pool de GSSG, qui se traduit par un rapport GSSG/GSH plus faible chez les lignées *N57* et *Q5* (**Figure 74 C**). Cette réduction cellulaire est également corrélée à un pool plus oxydé de NAD(H) et NADP(H). Comme discuté précédemment, le NADPH est utilisé par la GR pour maintenir l'état de réduction important du glutathion. Le NADPH est oxydé en NADP<sup>+</sup> par la GR qui réalise ainsi une réduction du GSSG en GSH (voir Introduction **Figure 23 A**). Un rapport NADP<sup>+</sup>/NADPH supérieur pourrait s'expliquer par une réduction stimulée du GSSG, au détriment du pool de NADPH, conduisant ainsi à un rapport GSSG/GSH plus faible. Il serait donc intéressant de déterminer si l'activité GR de ces plantes est augmentée.

Puisque nous travaillons avec une seule lignée mutante homozygote (l'autre lignée connue étant létale à l'état homozygote), nous avons engagé une complémentation du mutant *N57* par le gène de la QPT afin de confirmer la disparition du phénotype observé par la complémentation.

### 3. L'altération du pool de nucléotides à pyridine affecte la croissance des plantes mutantes *N57* et *Q5*.

---

Chez le mutant *N57*, la diminution du pool de nucléotides à pyridine s'accompagne de son oxydation. Il en résulte une forte altération de la croissance de ces plantes. Cette observation est à rapprocher du mutant *nadk2* chez lequel les niveaux de NADP(H) sont drastiquement diminués, ce qui s'accompagne d'une faible croissance et de capacités photosynthétiques moindres (Takahashi *et al.*, 2009). Dans le cas du mutant *N57*, on peut imaginer qu'une diminution du pool de NADPH contrarie la photosynthèse. Ceci peut rendre compte non seulement d'une baisse de NADPH disponible pour le cycle de Calvin, mais également d'une déplétion en NADPH utilisé par les navettes malate/OAA et qui contribue à la production d'ATP mitochondrial. Cette synthèse d'ATP est nécessaire au fonctionnement optimal du métabolisme carboné (Foyer *et al.*, 2011).



L'influence des niveaux altérés de nucléotides à pyridine sur les paramètres de la photosynthèse des mutants *N57* est abordée dans le chapitre suivant.

La diminution des teneurs en NADH chez les mutants *N57* est également susceptible d'affecter la croissance des plantes, eut égard à l'importance de ce nucléotide dans l'assimilation de l'azote. En effet le NADH est utilisé par la nitrate réductase dans le cytosol et une baisse en NADH pourrait affecter la réduction des nitrates, et par corolaire la croissance des plantes. Le chapitre suivant adresse justement cette question.

La disponibilité en azote influence profondément la biomasse et la croissance des parties aériennes, notamment au cours d'une carence azotée (Scheible *et al.*, 1997b ; Lemaire et Millard, 1999). Par ailleurs, le développement du système racinaire est étroitement lié au statut nutritionnel de la plante ainsi qu'à la disponibilité en nutriments dans le milieu extérieur. C'est notamment le cas pour le nitrate, bien que le rôle du système racinaire dans la perception de l'azote reste éluif. Lorsque le système racinaire principal évolue dans un milieu carencé en azote, les racines latérales tendent à se développer dans des zones riches en nitrates (Remans *et al.*, 2006). Par ailleurs, Zhang *et al.* (1999) ont montré qu'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* déficient en activité NR répondait toujours à un apport local en nitrates, mais pas à un ajout d'ammonium ou de Gln, concluant ainsi que l'élongation latérale des racines était régulée par le nitrate lui-même. Le faible développement des racines latérales chez le mutant *N57* et leur plus forte croissance chez le surexpresser *Q5* suggèrent une altération de la signalisation azotée engendrée par une perturbation métabolique répondant aux variations des teneurs en nucléotides à pyridine. Pellny *et al.* (2008) rapportent ainsi que chez le mutant du complexe I mitochondrial de tabac une diminution de la production de racines latérales est associée à un métabolisme azoté perturbé. Dans ce cas néanmoins, les teneurs en NADH sont fortement augmentées et l'état rédox du NAD est maintenu alors que le mutant *N57* d'*Arabidopsis thaliana*, qui présente les mêmes symptômes racinaires, possède des niveaux de NADH diminués. Inversement, le surexpresser *Q5*, dont le pool de NAD/P(H) est augmenté, a plus de racines latérales.

Le développement de la racine principale chez le mutant *N57*, à l'instar de ce qui est observé chez *CMSII* de tabac, est très fortement ralenti. A l'opposé, il est amplifié chez le surexpresser *Q5*. Pour autant, on ne peut pas affirmer que cette observation résulterait d'une





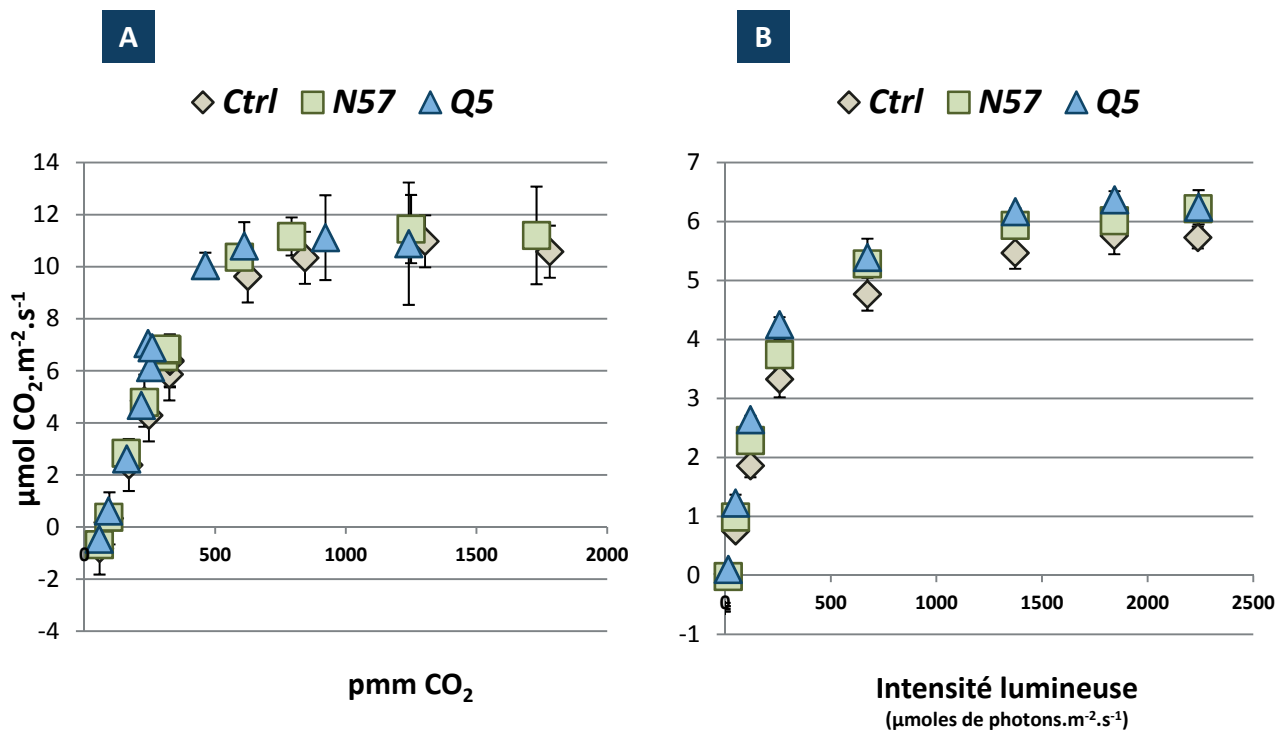
perturbation de la signalisation azotée. En effet, il semblerait que ce ne soit pas la signalisation azotée mais plutôt la disponibilité en eau qui stimulerait la croissance de la racine principale (Chapman *et al.*, 2011).

On peut aussi imaginer que les niveaux de nucléotides à pyridine, s'ils varient, affectent le métabolisme de telle manière qu'il s'ensuit une réduction ou une accélération de la croissance des plantes, et par corolaire un développement réduit ou accéléré d'organes comme les racines. Chez d'autres organismes comme les bactéries et les levures, on constate que des teneurs élevées en nucléotides à pyridine s'accompagnent d'une plus forte production de biomasse (Liu *et al.* 2006 ; Zhu *et al.*, 2008b). Il n'en demeure pas moins que chez les plantes la production de biomasse est soutenue par une coordination étroite des métabolismes C et N.



## CHAPITRE VI

**Conséquences physiologiques d'une dérégulation  
de la production de QPT d'*Arabidopsis thaliana* :  
perturbations de la balance (C/N)**



**C**

Lignées	Respiration à l'obscurité $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	Erreur standard (SE)
<i>Ctrl</i>	- 0.66	$\pm 0.23$
Mutant <i>N57</i>	- 0.65	$\pm 0.21$
SurexpressEUR <i>Q5</i>	- 0.71	$\pm 0.29$

**Figure 77. Mesures des échanges gazeux.** Les échanges gazeux ont été analysés *via* un appareillage Li-Cor (voir Matériels et Méthodes). A : courbe A(Ci) représentant la photosynthèse nette (A) en fonction de la fraction molaire en  $\text{CO}_2$ , sous une intensité lumineuse de  $300 \mu\text{moles de photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . B : courbe A(PAR) correspondant à la photosynthèse nette en fonction de l'intensité lumineuse (PAR pour *photosynthetically active radiations*), sous une fraction molaire en  $\text{CO}_2$  de 400 ppm. C : respiration à l'obscurité, obtenue en fin de mesure après arrêt de l'éclairage et stabilisation. Les valeurs correspondent à trois feuilles de trois plantes différentes par génotype,  $\pm$  SE de trois mesures.

## VI. Conséquences physiologiques d'une dérégulation de la production de QPT d'*Arabidopsis thaliana* : perturbations de la balance (C/N)

---

### A. But de l'étude

---

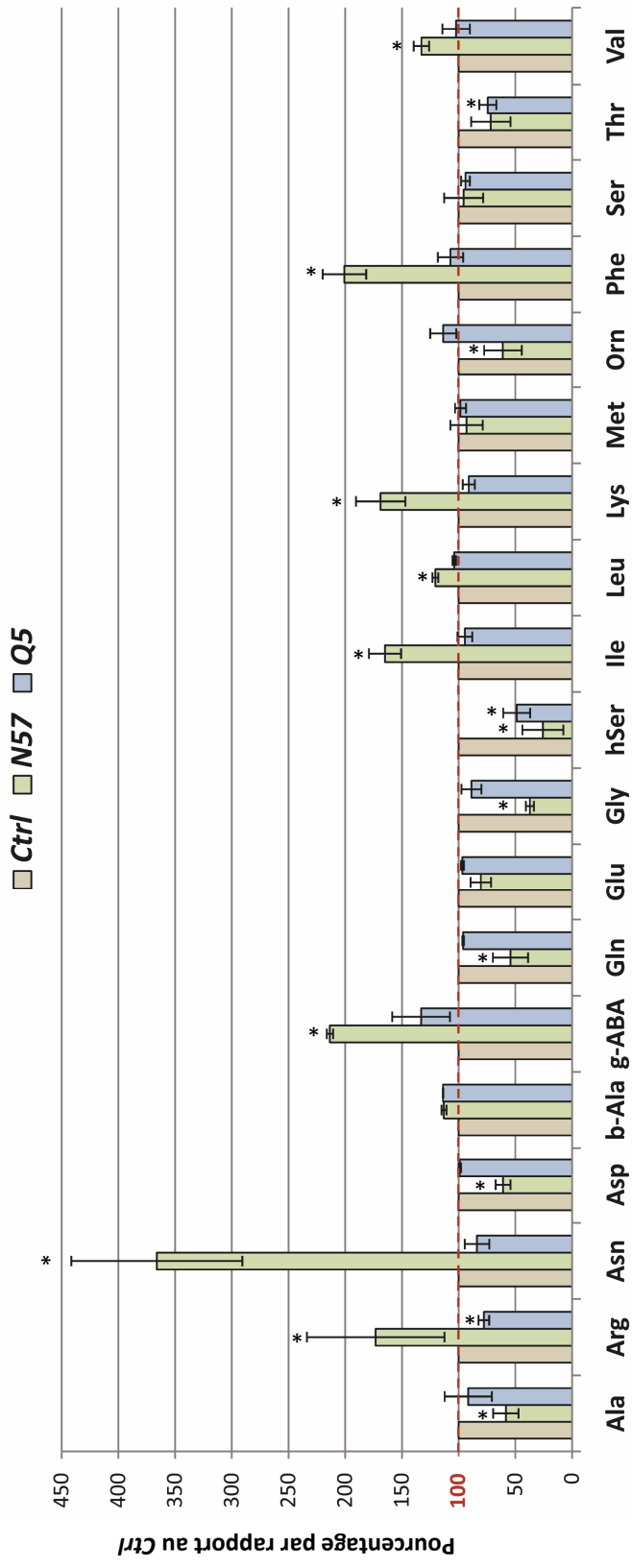
La caractérisation des lignées *N57* et *Q5* apporte deux outils dérégulés de façon opposée dans la production de QPT chez *Arabidopsis thaliana*. L'objectif de ce chapitre est d'analyser quelles sont les conséquences physiologiques d'une manipulation de la biosynthèse du NAD chez des plantes présentant des niveaux et des flux de biosynthèse de nucléotides à pyridine altérés de façon constitutive. Le mutant *N57* est non seulement affecté dans le pool total de NAD/P(H), mais il présente également une altération de la balance rédox du NAD, ce qui laisse penser des conséquences métaboliques et donc physiologiques plus importantes chez cette lignée.

Étant donné la perturbation du métabolisme primaire et notamment de la balance azotée observée en réponse à une surproduction inductible de NAD (Chapitres II et III), nous avons orienté l'étude des plantes *N57* et *Q5* vers l'analyse de diverses composantes du métabolisme C et N, en particulier la mesure des teneurs en métabolites primaires (acides aminés, intermédiaires du cycle de Krebs, sucres, etc.). Au vu des résultats obtenus, nous avons entamé une étude dont l'objectif est d'établir l'influence de la production de NAD dans la régulation de l'assimilation azotée.

### B. Les pools altérés de NAD/P(H) ne sont pas associés à une modification des paramètres photosynthétiques

---

À la lumière, lors des processus photosynthétiques, le pool de NADPH est majoritairement consommé au cours de la fixation du CO<sub>2</sub> par le cycle de Calvin. Le NADP<sup>+</sup>



**Figure 78. Fluctuations des pools d'acides aminés chez les lignées Ctrl, N57 et Q5.** Les acides aminés ont été quantifiés par technique HPLC (voir Matériels et Méthodes). Chaque histogramme représente la moyenne du dosage de trois échantillons biologiques indépendants de plantes Ctrl (barres beiges), du mutant N57 (barres vertes) et du surexpresser Q5 (barres bleues),  $\pm$  SE de trois mesures. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'acides aminés par rapport au Ctrl (les pointillés rouges indiquent 100 %). Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au contrôle correspondant (\*  $P < 0.05$ , test t de Student).

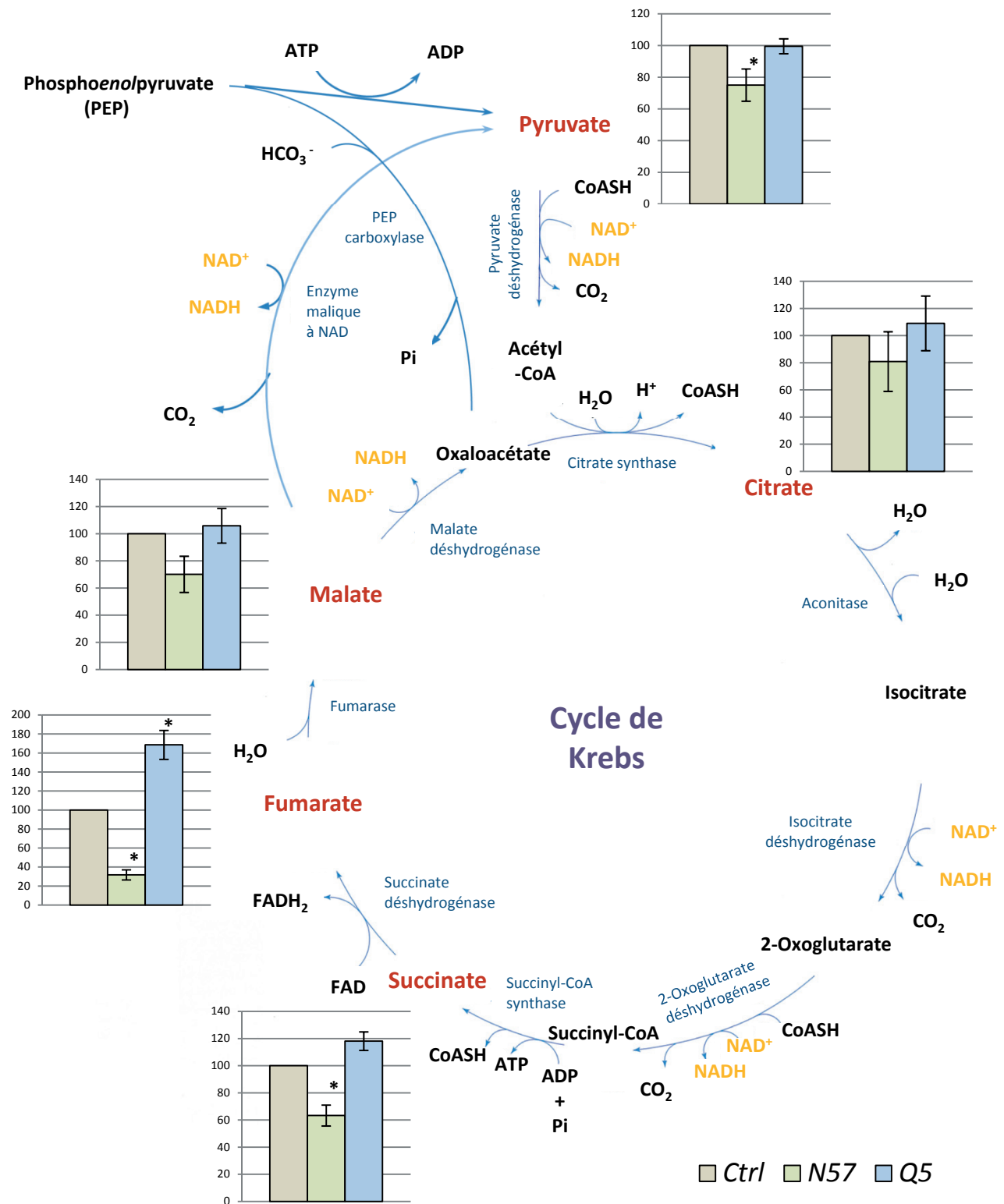
est régénéré dans le plaste en NADPH par la ferrédoxine-NADP<sup>+</sup> réductase, enzyme chloroplastique clé. D'autres enzymes peuvent également intervenir dans la production de NADPH, comme par exemple les glucose-6-phosphate déshydrogénases (G6PDH, EC 1.1.1.49) et les isocitrate déshydrogénases (ICDH, EC 1.1.1.41 ; 1.1.1.42) localisées dans divers compartiments subcellulaires (Noctor, 2006). Ce phénomène, associé à l'utilisation du NAD(P)(H) par différentes enzymes du cycle de Calvin, suggère une dynamique certaine du pool de nucléotides à pyridine dans le contexte de photosynthèse. C'est en raison du rôle fondamental du NADP<sup>+</sup> comme accepteur terminal de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons que nous nous sommes intéressés à l'impact d'une dérégulation de la biosynthèse du NAD sur les capacités photosynthétiques des plantes. Cette problématique a été investiguée chez les lignées *Ctrl*, *N57* et *Q5* par des mesures préliminaires d'échanges gazeux *via* un appareillage Li-Cor 6400 XT (Lincoln, USA). Les feuilles illuminées réalisent simultanément l'assimilation photosynthétique et la photorespiration, même si le premier processus est numériquement supérieur, masquant presque complètement le signal respiratoire à la lumière. Le système utilisé mesure plusieurs paramètres. Les courbes A (Ci) correspondent à l'évolution de la photosynthèse nette (A) en fonction de la fraction molaire de CO<sub>2</sub> (**Figure 77 A**). Les courbes A (PAR), où PAR signifie *Photosynthetically Active Radiation* (Radiation Photosynthétique Active), sont déterminées en faisant varier l'intensité lumineuse (**Figure 77 B**). Enfin, le système d'échange gazeux permet aussi de mesurer la respiration à l'obscurité, après arrêt de l'éclairage et stabilisation (**Figure 77 C**). Les analyses préliminaires réalisées indiquent que les lignées *N57* et *Q5* présentent les mêmes réponses photosynthétiques que le *Ctrl* (**Figures 77 A et B**). La valeur de la respiration à l'obscurité ne varie pas de façon prononcée et se situe autour de - 0.6 μmoles d'O<sub>2</sub>.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (**Figure 77 C**).

### C. La modification de la production de NAD affecte les niveaux de métabolites carbonés et azotés

---

Les métabolismes azoté et carboné sont intimement associés chez les plantes. L'assimilation de l'azote aboutit à l'incorporation d'ammonium en acides aminés à partir de squelettes carbonés (acides cétoniques, α-cétoglutarate, etc.). Cette synthèse nécessite



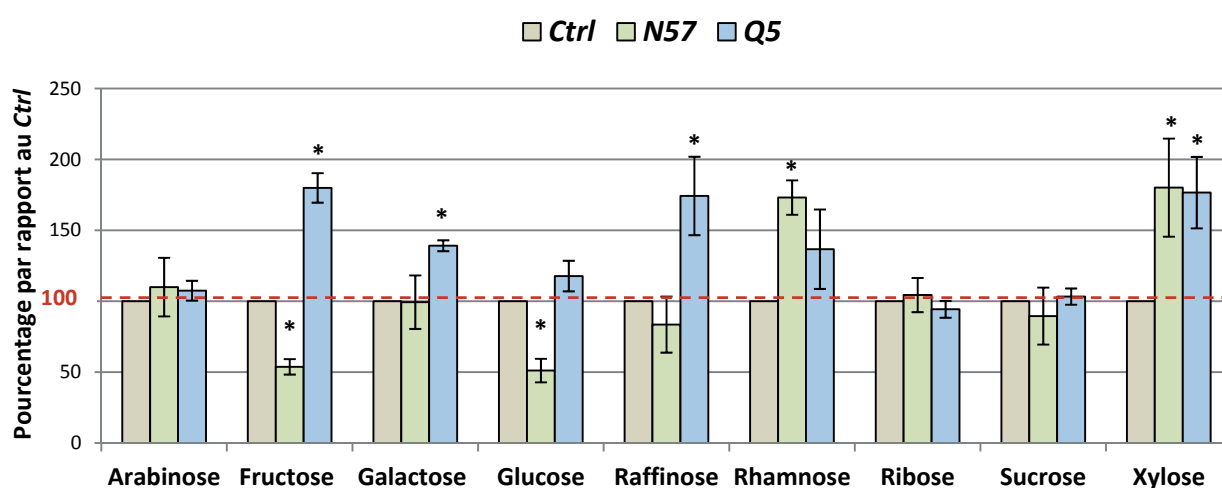


**Figure 79. Modifications des niveaux d'intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs.** Les métabolites figurant en rouge ont été dosés par technique GCMS (voir Matériels et Méthodes). Les histogrammes correspondent à la moyenne d'une quantification relative obtenue à partir de trois échantillons biologiques indépendants de plante *Ctrl* (barres beiges), du mutant *N57* (barres vertes) et du surexprimeur *Q5* (barres bleues),  $\pm$  SE de trois mesures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de métabolites par rapport au *Ctrl*. En orange est indiqué le pool de nucléotides à pyridine utilisé lors du cycle de Krebs. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student).

également l'énergie chimique (ATP) et le pouvoir réducteur du NADP/(H) issus des processus photosynthétiques de fixation du CO<sub>2</sub>. Puisque nous disposons de systèmes altérés dans les niveaux de NADP/(H), une étude du métabolome (HPLC et GCMS) a été réalisée chez les mutants *N57* et *Q5* et montre de fortes fluctuations métaboliques. C'est surtout le cas chez la lignée *N57* qui présente des variations très marquées des pools d'acides aminés libres et d'intermédiaires du cycle de Krebs. Sur les 19 acides aminés quantifiés par HPLC, 15 sont modulés dans leurs niveaux stationnaires, exprimés en pourcentage par rapport au *Ctrl* (**Figure 78**). Plus précisément 8 acides aminés augmentent chez *N57* par rapport au *Ctrl*. L'Arg, l'Asn, le g-ABA, l'Ile, la Lys, la Phe et la Val s'accumulent chez le mutant *N57*. Cette augmentation se fait surtout au profit d'acides aminés à faible rapport C/N, en d'autres termes ceux riches en azote comme l'Arg et l'Asn. Dans une moindre mesure, les niveaux de Leu sont également stimulés. A ces enrichissements s'ajoutent des diminutions sévères de certains acides aminés tels que l'Ala, l'Asp, la Gln, la Gly et l'hSer (**Figure 78**). Les pools de Glu, Orn et Thr diminuent également, mais de façon plus modérée chez le mutant *N57* par rapport au *Ctrl*.

Par ailleurs, le profilage métabolique par technique GCMS révèle une modification des niveaux d'intermédiaires métaboliques associés au cycle de Krebs chez le mutant *N57* (**Figure 79**). Parmi les cinq intermédiaires quantifiés (pyruvate, citrate, succinate, fumarate et malate), tous présentent une diminution de leurs teneurs chez *N57* par rapport au *Ctrl*. Cette chute est plus prononcée pour le succinate et le fumarate (**Figure 79**).

La lignée *N57* est également affectée dans le pool de sucres solubles. Par rapport au *Ctrl*, les teneurs en glucose et fructose diminuent substantiellement chez le mutant *N57* (**Figure 80**). A l'inverse, d'autres sucres comme le rhamnose et le xylose sont augmentés. En revanche, le sucrose (autre nom donné au saccharose) ne varie pas par rapport au *Ctrl*. Cette diminution du pool d'hexoses (glucose et fructose) ne semble cependant pas associée à une perturbation de la capacité photosynthétique chez le mutant (**Figure 80**), mais peut être due à une utilisation accrue de ces métabolites carbonés.

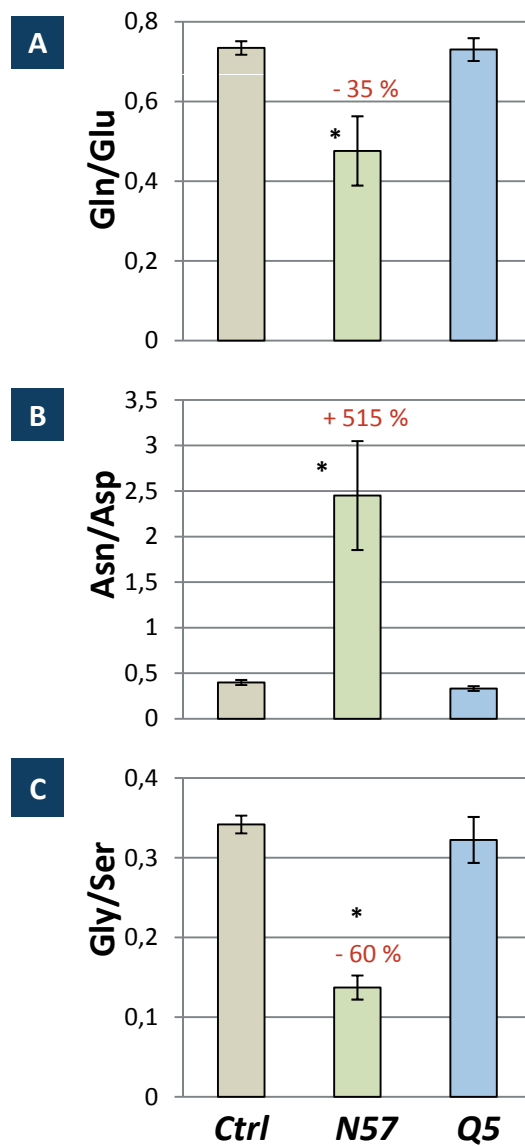


**Figure 80. Mesures des sucres solubles par technique GCMS.** La quantification est relative par rapport à un standard interne, ici le ribitol. Les histogrammes correspondent à la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants de plante *Ctrl* (barres beiges), du mutant *N57* (barres vertes) et du surexprimeur *Q5* (barres bleues),  $\pm$  SE de trois mesures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de métabolites par rapport au *Ctrl* (les pointillés rouges correspondent au 100 % de la lignée *Ctrl*). Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student).

Concernant le surexpresser *Q5*, malgré une augmentation constitutive de 35 % du pool de NAD, l'impact sur la balance azotée reste peu marqué (**Figure 78**). Notons cependant une diminution des pools d'Arg, hSer et de Thr chez le *Q5* par rapport au *Ctrl*. Pour ce qui est des intermédiaires du cycle de Krebs, le succinate et surtout le fumarate voient leurs pools s'accroître chez le surexpresser par rapport aux plantes *Ctrl* (**Figure 79**). Par ailleurs, sur les 9 sucres solubles analysés, 6 augmentent de façon substantielle. Notamment, les niveaux de fructose, galactose, raffinose et xylose sont supérieurs par rapport au *Ctrl* (**Figure 80**). Ces observations mettent en relief l'impact de la production de NAD sur l'utilisation des pools de sucres et d'acides organiques engagés dans les voies de la glycolyse et du cycle de Krebs.

Les variations observées dans le pool de métabolites azotés nous ont menés à déterminer certains rapports clé d'acides aminés. Le rapport Gln/Glu reste comparable chez les plantes *Ctrl* et *Q5* (0.73 environ, **Figure 81 A**). Il diminue cependant de 35 % chez le mutant *N57*. Il est intéressant de noter aussi un réajustement du rapport Asn/Asp (**Figure 81 B**). En effet, chez la lignée *N57*, ce rapport est très nettement augmenté, surtout en raison d'une accumulation du pool d'Asn, mais également à cause d'une diminution des niveaux d'Asp (**Figure 81 C**).

Concernant la conversion Gly-Ser, alors que le rapport est comparable chez le surexpresser *Q5* et le *Ctrl* (0.34), il est très affecté chez le mutant *N57*, avec une chute de 60 % par rapport au *Ctrl* (**Figure 81 C**). Cette diminution drastique du rapport Gly/Ser est liée à une déplétion du pool stationnaire de Gly chez le mutant *N57* (**Figure 78**). Les niveaux de Ser quant à eux restent stables pour les trois lignées étudiées (**Figure 78**). Une variation des niveaux de Gly et Ser est souvent assimilée à une perturbation de la photorespiration.



**Figure 81. Fluctuations des rapports clé d'acides aminés impliqués dans l'assimilation primaire et photorespiratoire du  $\text{NH}_4^+$ .** Les différents rapports ont été calculés à partir de la quantification absolue des acides aminés réalisée en HPLC (voir Matériels et Méthodes). Ils correspondent à trois échantillons biologiques indépendants de plante *Ctrl* (barres beiges), du mutant *N57* (barres vertes) et du surexprimeur *Q5* (barres bleues),  $\pm$  SE de trois mesures. Pour les lignées *N57* et *Q5* figurent au dessus des histogrammes le pourcentage de variation calculé par rapport au *Ctrl*. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student).

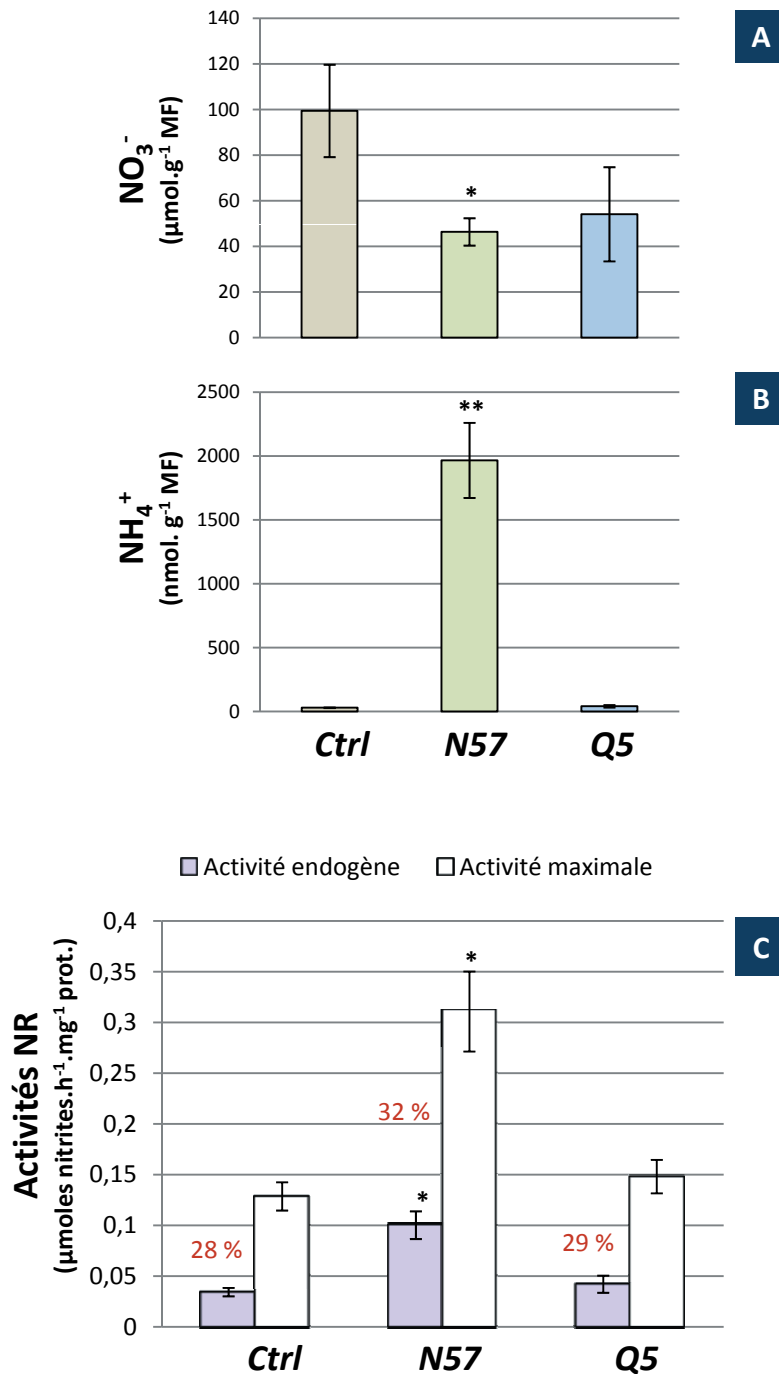
D. Les niveaux de nitrates, d'ammonium et de NR sont modifiés dans les plantes mutantes

---

Les fortes fluctuations du métabolisme azoté en réponse à la dérégulation de la production de QPT nous ont conduits à mesurer chez les plantes *N57* et *Q5* les teneurs foliaires en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ , à l'aide d'un système de sondes ioniques sélectives. Chez les deux lignées dérégulées dans la production de QPT, les niveaux de nitrates chutent, en particulier chez le mutant *N57* où ils sont divisés par deux (**Figure 82 A**). Chez la lignée *N57*, la baisse du  $\text{NO}_3^-$  s'associe à une augmentation considérable du pool de  $\text{NH}_4^+$  (niveaux 60 fois supérieurs par rapport au *Ctrl*) (**Figure 82 B**). Chez le surexpresser *Q5*, ce phénomène est beaucoup plus discret mais on observe quand même une augmentation de 30 % des teneurs en ammonium.

L'assimilation de l'azote chez les plantes débute par une réduction des nitrates en nitrites, réaction catalysée par l'enzyme NR. Il peut alors apparaître pertinent de mesurer la capacité de cette enzyme qui occupe une place critique dans le métabolisme azoté. Les activités foliaires extractibles *in vitro* de la NR ont été évaluées en présence de  $\text{MgCl}_2$  (capacité endogène) et d'EDTA (capacité maximale) pour les feuilles de plantes *Ctrl*, *N57* et *Q5* (**Figure 82 C**). La différence donnée entre les deux activités détermine le pourcentage d'activation de l'enzyme, ou phosphorylation apparente. Les mesures biochimiques montrent une augmentation importante des activités NR chez le mutant *N57* en présence de  $\text{MgCl}_2$  et d'EDTA (**Figure 82 C**). Le pourcentage d'activation de l'enzyme est un peu plus important : 28 % chez le *Ctrl* contre 32 % chez le mutant *N57*. Pour ce qui est du surexpresser *Q5*, les activités endogène et maximale potentielle sont comparables à celles retrouvées chez le *Ctrl*. Il en est de même de l'état d'activation de l'enzyme (28 %).

En complément de l'activité NR, nous avons mesuré l'expression des gènes *NIA1* et *NIA2* codant les deux isoformes de NR chez *Arabidopsis thaliana* ainsi que le gène de la nitrite réductase *NIR1* (**Figure 83**). Chez le mutant *N57*, les niveaux de transcrits *NIA1* et *NIA2* sont diminués par rapport au *Ctrl*, notamment pour le gène *NIA2* dont l'expression est réprimée d'environ 88 %. Les messagers *NIR1* quant à eux apparaissent diminués de moitié.



**Figure 82. Mesures foliaires des ions nitrate, ammonium et capacité nitrate réductase.** A : dosage des ions nitrate à l'aide d'une sonde ionique sélective sur la fraction soluble de la lignée *Ctrl* (barres beiges), du mutant *N57* (barres vertes) et du surexprimeur *Q5* (barres bleues). B : mesures des ions ammonium par sonde sélective. C : activité nitrate réductase endogène (en présence de  $\text{MgCl}_2$ ) et maximale extractible (en présence d'EDTA) (voir Matériels et Méthodes). Les histogrammes indiquent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants,  $\pm$  SE de trois mesures. Pour la mesure des activités NR, figurent en rouge les pourcentages d'activation de l'enzyme. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , test *t* de Student).

Concernant le surexpressueur *Q5*, un profil similaire d'inhibition transcriptionnelle des gènes *NIA1*, *NIA2* et *NIR1* est observé (**Figure 83**). Environ quatre fois moins de transcrits *NIA1* sont détectés chez *Q5* et une répression de l'ordre de 73 % est à noter pour *NIA2*. Le gène *NIR1* suit la même tendance avec une inhibition de son expression d'environ 60 %.

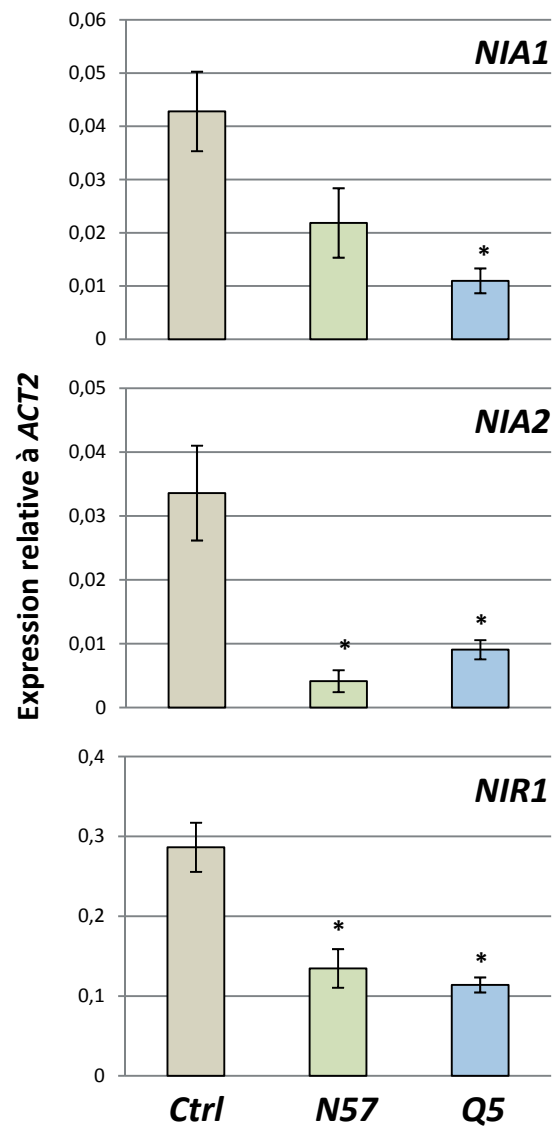
La modification du rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  chez *N57* semble corrélée à la modification de l'activité NR. Il n'existe pour autant pas de corrélation entre les niveaux de transcrits NR et l'activité de l'enzyme. Les niveaux de transcrits sont plutôt corrélés avec les teneurs en  $\text{NO}_3^-$ .

#### E. La dérégulation des niveaux de NAD s'accompagne d'une augmentation du flux d'azote *in vivo*

---

La mesure de l'activité NR n'est pas indicative du flux *in vivo*, mais reflète pour l'essentiel une capacité biochimique. Afin d'investiguer l'incorporation réelle d'azote par les plantes, nous avons mesuré la composition isotopique ( $\delta^{15}\text{N}$ ) *via* un analyseur élémentaire couplé à la spectrométrie de masse à ratio isotopique (EA-IRMS). Pour cela, des échantillons de feuilles et de racines des lignées *Ctrl*, *N57* et *Q5* ont été récoltés au cours d'expériences de 5 jours de marquage par ajout de nitrates marqués au  $^{15}\text{N}$  ( $\text{KNO}_3$  98 %) dans le milieu de culture hydroponique. Les flux racinaire et foliaire ont été déterminés sur des échantillons témoins et marqués. Hors marquage, le mutant *N57* se caractérise par une augmentation du  $\delta^{15}\text{N}$  foliaire (2.20 vs 3.43 ‰) (**Figure 84 A**). Ce phénomène est encore plus prononcé dans les racines (-7.71 vs -5.40 ‰). Après marquage avec une source de  $^{15}\text{N}$ , les flux  $\delta^{15}\text{N}$  foliaire et racinaire sont largement stimulés chez le mutant *N57* (**Figure 84 B**). Concernant le surexpressueur *Q5*, alors que l'abondance naturelle  $\delta^{15}\text{N}$  (hors marquage) diminue sensiblement dans les feuilles par rapport au *Ctrl*, elle augmente dans les racines (**Figure 84 A**). Après marquage, les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  suivent la même tendance chez le surexpressueur *Q5* que chez le mutant *N57*. Les flux foliaire et racinaire sont stimulés chez *Q5*





**Figure 83. Analyses des niveaux de transcrits foliaires des enzymes nitrate réductase et nitrite réductase.** Expression relative par rapport au gène de référence *ACT2* (*At3g18780*). Les histogrammes représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants de plante *Ctrl* (barres ocre), du mutant *N57* (barres vertes) et du surexprimeur *Q5* (barres bleues),  $\pm$  SE de trois mesures. L'extraction d'ARN a été réalisée sur des feuilles cultivées 31 jours en chambre de culture *Jours Courts* (voir Matériels et Méthodes). *NIA1* (*At1g77730*) code pour l'isoforme NR1 de la nitrate réductase ; *NIA2* (*At1g37130*) pour l'isoforme NR2 et *NIR1* (*At2g15620*) pour la nitrite réductase NiR. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student).

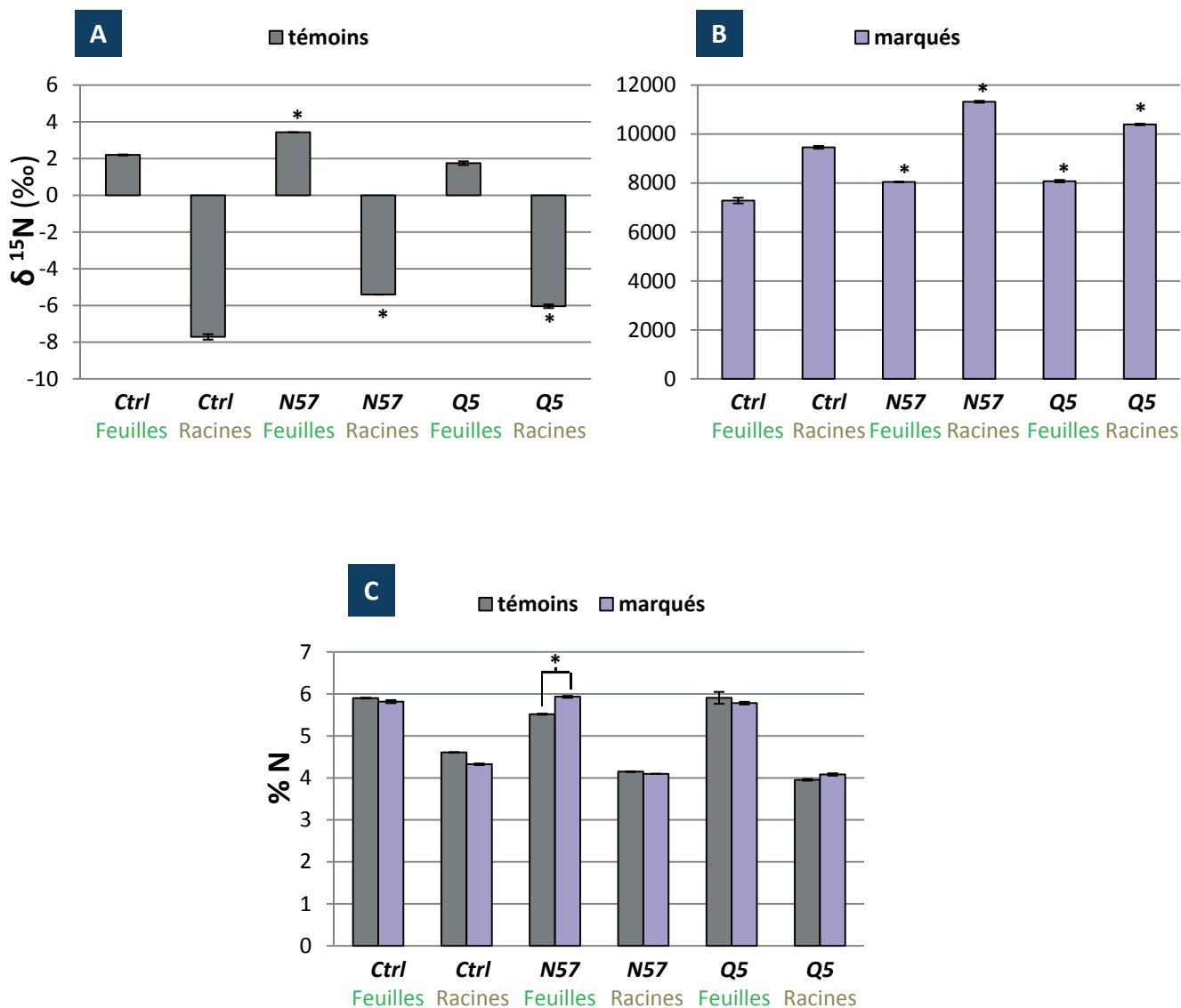
(**Figure 84 B**). Il apparaît en somme que l'incorporation du  $^{15}\text{N}$  est favorisée chez le mutant *N57* surtout, mais également chez le surexprimeur *Q5*.

En parallèle à l'analyse isotopique, une mesure du pourcentage d'azote (% N) a été réalisée sur les échantillons témoins et marqués. Il est vrai que les dosages d'acides aminés, de nitrate et d'ammonium, ainsi que de l'activité NR suggèrent fortement une perturbation du flux azoté, en particulier chez le mutant *N57*. Chez cette lignée mutante, l'accumulation d'acides aminés à faible rapport C/N (Arg et Asn) nous laissait penser à une altération de la quantité d'azote disponible. La **Figure 84 C** illustre les % N déterminés sur la matière organique totale obtenue à partir de feuilles ou racines préalablement lyophilisées. Pour les échantillons témoins, le mutant *N57* présente un % N foliaire sensiblement réduit par rapport au *Ctrl* et diminué de façon plus marquée dans les racines (**Figure 84 C**). Le surexprimeur *Q5* quant à lui n'est pas substantiellement affecté dans le % N foliaire, en revanche cette valeur diminue dans les racines (**Figure 84 C**). Après marquage, alors que l'ajout de nitrates marqués aurait tendance à diminuer le % N chez le *Ctrl* et *Q5*, chez le mutant *N57*, le % N augmente modérément (différence entre les échantillons témoins et marqués, soit 5.52 vs 5.93 %), et ce uniquement pour les feuilles (**Figure 84 C**).

#### F. Les transcrits associés au transport du nitrate et de l'ammonium sont modulés chez les lignées *N57* et *Q5*

---

Nombreuses sont les données issues de la littérature en faveur d'une régulation transcriptionnelle des gènes du transport du  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ . De faibles concentrations en nitrates (50  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$ ) induisent notamment l'expression des gènes *AtNRT1.1* et *ATNRT2.1* (Filleur et Daniel-Vedele, 1999). Par ailleurs, les gènes *AMT* sont induits à la lumière par le métabolisme carboné et la carence azotée (Lejay *et al.*, 2003; Loqué *et al.*, 2005; 2006). Une resupplémentation en  $\text{NH}_4^+$  après un stress nutritionnel entraîne également l'inhibition glutamine-dépendante de l'expression d'*AMT1.1* (Rawat *et al.*, 1999). A l'égal de *NRT2.1*, le rétrocontrôle d'*AMT1.1* dépend de la disponibilité locale en azote et non pas d'une

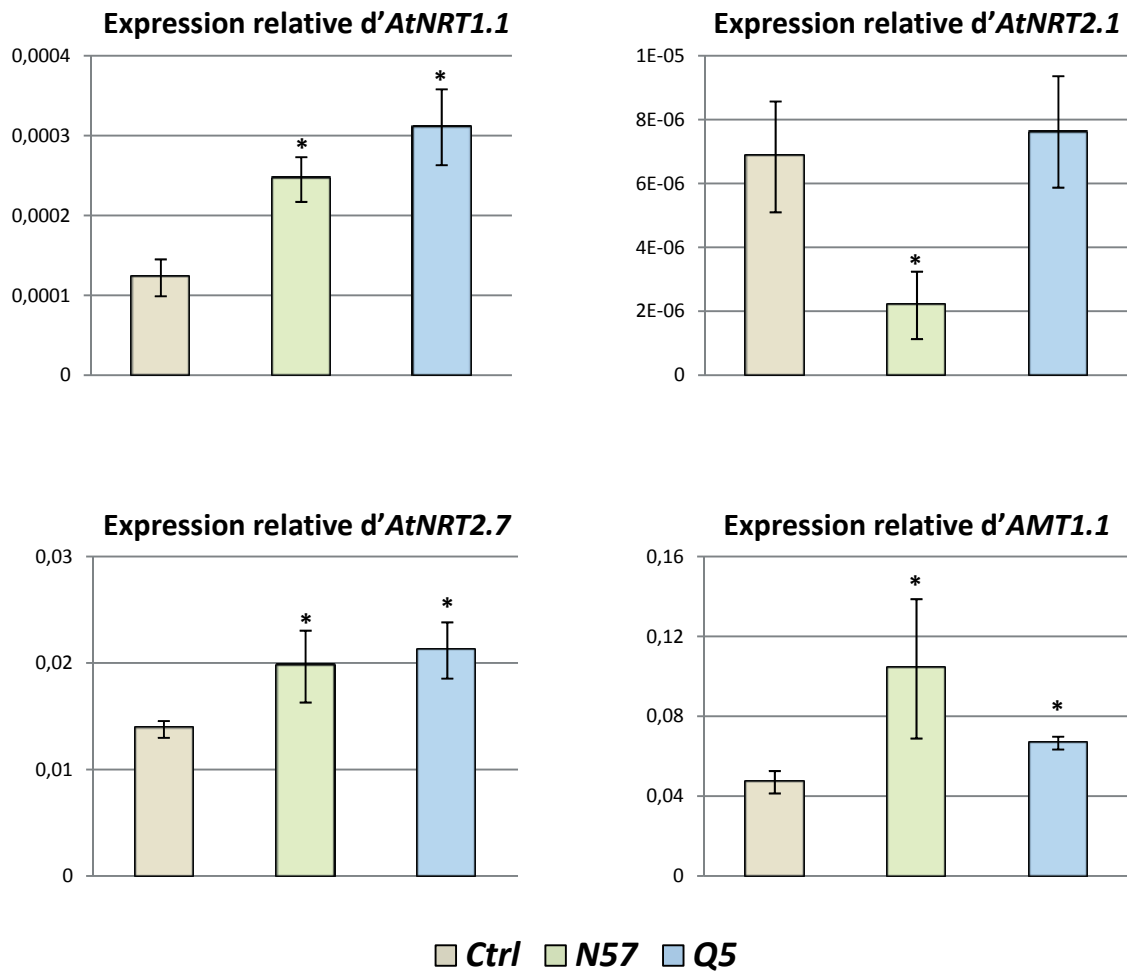


**Figure 84. Analyses foliaire et racinaire de l'abondance naturelle  $\delta^{15}\text{N}$  et du pourcentage d'azote (%N) avant et après marquage au  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ .** A et B : mesure du  $\delta^{15}\text{N}$  avant (A) et après 5 jours de marquage (B) au  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  (voir Matériels et Méthodes). Les résultats ont été obtenus par couplage d'un analyseur élémentaire (EA) et de la spectrométrie de masse à ratio isotopique (IRMS). Ils correspondent à trois échantillons biologiques indépendants des différentes lignées, préalablement lyophilisés avant analyses. C : %N avant et après marquage. Les histogrammes correspondent à la moyenne des données obtenues par condition,  $\pm$  SE de trois mesures. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au contrôle correspondant (\*  $P < 0.05$ , test  $t$  de Student).

signalisation à longue distance (Gansel *et al.*, 2001). C'est dans ce contexte de régulation de l'assimilation azotée qu'une analyse transcriptomique par RT-qPCR a été engagée en ciblant l'expression d'un certain nombre de gènes liés à l'assimilation du nitrate et de l'ammonium, et d'autres codant des enzymes clé du métabolisme azoté. AtNRT1.1 est un transporteur à double affinité (Wang *et al.*, 1998 ; Guo *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 1999) et également un senseur du nitrate (Ho *et al.*, 2009). Bien que sa localisation soit racinaire, divers éléments issus de la littérature ont montré l'expression du gène dans les parties aériennes (Wang *et al.*, 2000 ; 2003 ; Guo *et al.*, 2003).

La mesure des niveaux de transcrits foliaires montre une induction du gène *AtNRT1.1* à la fois chez le mutant *N57* et chez le surexprimeur *Q5* (**Figure 85**). Les messagers s'accumulent d'un facteur 2 chez le mutant et 2.5 chez le surexprimeur. Pour ce qui est du transporteur à haute-affinité (HATS) *AtNRT2.1*, les niveaux de transcrits sont comparables chez le *Ctrl* et *Q5* (**Figure 85**). Néanmoins, ce gène est fortement réprimé chez *N57* avec une chute des niveaux de transcrits de plus de 60 %, peut-être en raison de la forte accumulation de  $\text{NH}_4^+$  chez le mutant (**Figure 85**). Un autre transporteur de type HATS présente un profil d'induction. Il s'agit d'un transporteur foliaire codé par le gène *AtNRT2.7* qui intervient dans le contrôle des niveaux de nitrates dans les feuilles et les graines (Chopin *et al.*, 2007b). Les transcrits de ce gène s'accumulent à la fois chez le mutant *N57* et le surexprimeur *Q5* (**Figure 85**).

Le transport de l'ammonium est également perturbé au niveau transcriptionnel chez *N57* et *Q5*. L'expression du gène *AtAMT1.1* codant un transporteur d'ammonium à haute-affinité est supérieure de 50 % environ chez le surexprimeur *Q5* par rapport au *Ctrl* (**Figure 85**). En revanche, les niveaux de transcrits sont presque triplés chez le mutant *N57* (**Figure 85**).



**Figure 85. Analyses foliaires RT-qPCR du transport du nitrate et de l'ammonium.** Expression relative par rapport au gène de référence *ACT2* (*At3g18780*). Les valeurs correspondent à la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants,  $\pm$  SE de trois mesures. L'extraction d'ARN a été réalisée sur des feuilles cultivées 31 jours en chambre de culture *Jours Courts* (voir Matériels et Méthodes). Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student).

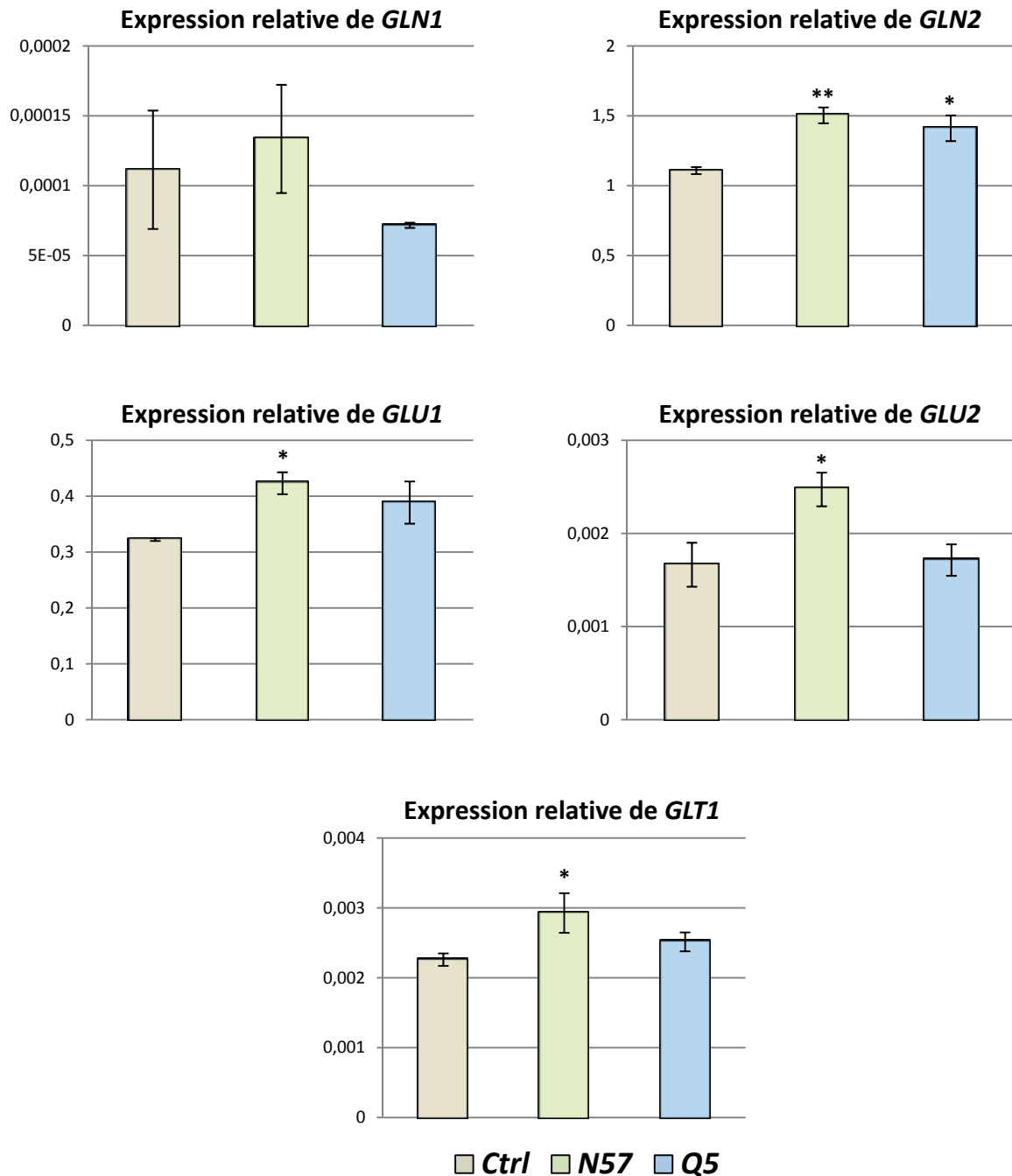
G. Le système GS/GOGAT est induit par l'altération des niveaux de nucléotides à pyridine

---

L'analyse transcriptomique du transport du nitrate et de l'ammonium a été étendue à la mesure du niveau d'expression de gènes codant d'autres enzymes clé du métabolisme azoté. Compte tenu des variations prononcées de rapport d'acides aminés impliqués dans la photorespiration (**Figure 86**) et de l'augmentation de  $\text{NH}_4^+$  chez *N57*, l'étude s'est portée sur les niveaux de transcrits des gènes impliqués dans le cycle GS/GOGAT, responsable de l'incorporation d'ammonium en acides aminés.

Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs gènes codent les isoformes de GS (Lothier *et al.*, 2011). *GLN1* (*At1g48470*) et *GLN2* (*At5g3560*) codent respectivement des isoformes cytosolique et chloroplastique/mitochondriale de la GS (**Figure 86**). Chez le mutant *N57* et le surexprimeur *Q5*, le profil d'expression chaotique de *GLN1* ne nous permet pas de définir une tendance claire. Néanmoins, il est intéressant de remarquer une augmentation substantielle des messagers *GLN2* chez les deux lignées dérégulées dans la production de QPT (**Figure 86**). En effet, la GS est induite au niveau transcriptionnel d'environ 50 % chez le mutant *N57* et le surexprimeur *Q5*.

De surcroît, nous avons mesuré les transcrits de trois gènes impliqués dans l'activité glutamate synthase (GOGAT), c'est-à-dire des gènes codant les isoformes Fd-GOGAT, *GLU1* (*At5g04140*) et *GLU2* (*At2g41220*) ainsi que le gène *GLT1* (*At5g53460*) de l'isoforme NADH-GOGAT. Chez le mutant *N57*, l'expression des trois gènes est stimulée par rapport au *Ctrl* (**Figure 86**). *GLU1* est induit d'environ 30 %, *GLU2* de presque 50 % et *GLT1* de 26 %. Concernant le surexprimeur *Q5*, les variations observées sont beaucoup moins prononcées par comparaison avec la lignée *Ctrl* (**Figure 86**). En somme, le système GS/GOGAT semble induit au niveau transcriptionnel chez le mutant *N57*.



**Figure 86. Analyses foliaires RT-qPCR des transcrits impliqués dans le système GS/GOGAT.** Expression relative par rapport au gène de référence *ACT2* (*At3g18780*). Les valeurs correspondent à la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants,  $\pm$  SE de trois mesures. L'extraction d'ARN a été réalisée sur des feuilles cultivées 31 jours en chambre de culture *Jours Courts*. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative par rapport au *Ctrl* (\*  $P < 0.05$ , test *t* de Student).

## H. Conclusion et discussion

---

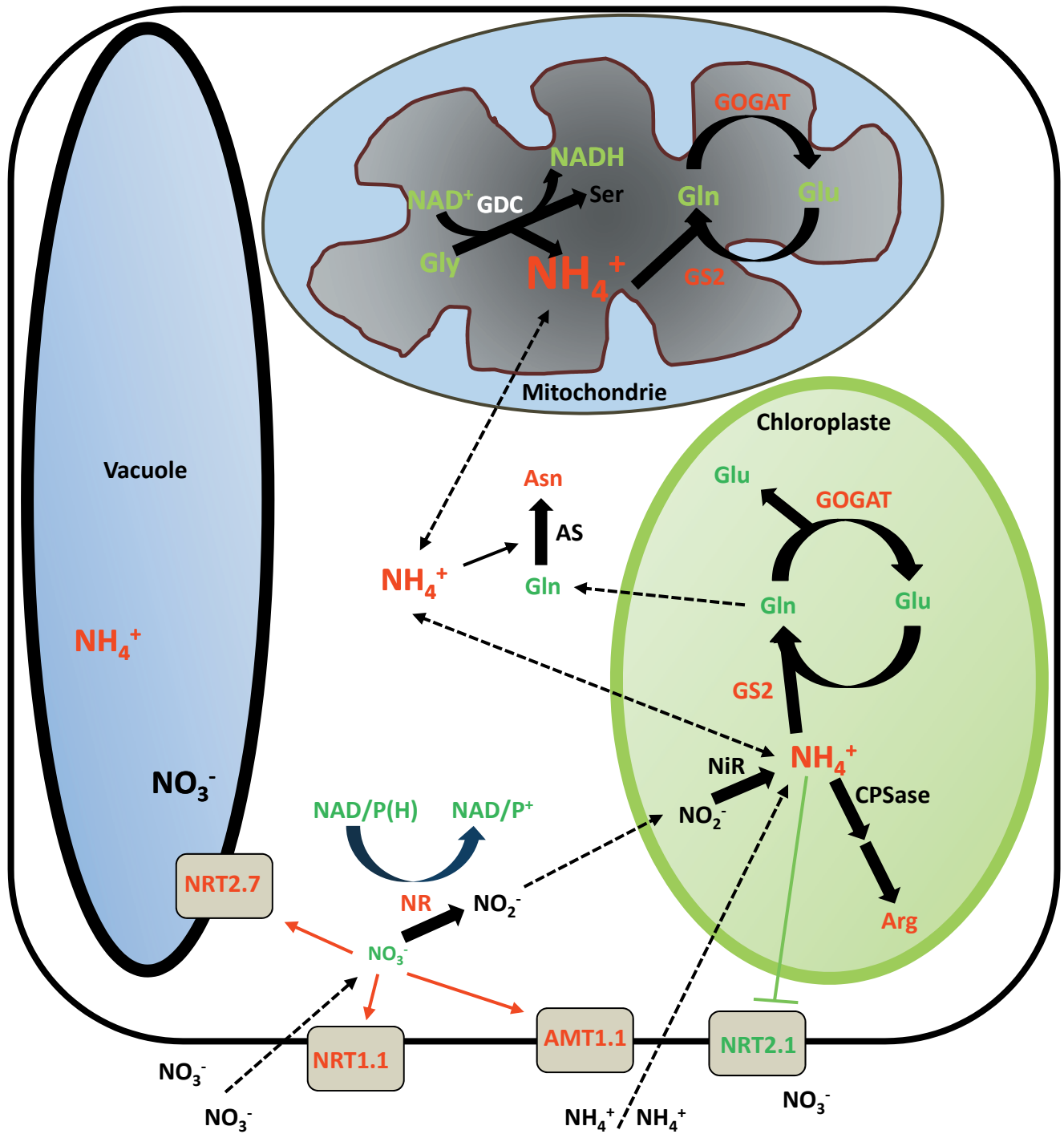
Les interactions entre les métabolismes du carbone et de l'azote sont cruciales chez les végétaux afin d'assurer une assimilation efficace de ces deux éléments nécessaires à une croissance harmonieuse. Bien que ces deux voies métaboliques soient bien documentées, les mécanismes régulateurs sous-jacents restent mal compris. L'analyse métabolomique et physiologique des lignées *N57* et *Q5*, dérégulées dans la production de QPT, laisse penser à un rôle important de l'homéostasie du NAD dans l'assimilation de l'azote chez *Arabidopsis thaliana*.

### 1. Les mutants *N57* et *Q5* présentent un métabolisme primaire profondément perturbé

---

L'ammonium peut provenir de la réduction du nitrate, de la photorespiration ou encore du recyclage des acides aminés. Son assimilation est essentiellement réalisée dans les plastes par le système GS/GOGAT et potentiellement dans les mitochondries (Lea et Mifflin, 1974 ; Lea et Forde, 1994 ; Jamai *et al.*, 2009). La glutamine synthétase (GS, EC 6.3.1.2) fixe le  $\text{NH}_4^+$  sur une molécule de Glu pour former la Gln. La Gln ainsi synthétisée réagit subséquemment avec le 2-oxoglutarate (2-OG) pour produire deux molécules de Glu, grâce à l'intervention de la glutamine 2-oxoglutarate aminotransférase, encore appelée glutamate synthase ou GOGAT. Deux familles de gènes nucléaires codent la GS : *GLN2* (*At5g35630*) et *GLN1* (*At1g48470*). *GLN2*, présent en une seule copie pour les espèces végétales étudiées jusqu'alors, est responsable de la production de GS2, impliquée dans l'assimilation dite primaire de l'ammonium issu de la réduction du nitrate et dans la ré-assimilation de l'ammonium photorespiratoire chez les plantes en  $\text{C}_3$ . La famille *GLN1* code les isoformes cytosoliques GS1 que l'on retrouve dans différents organes (racines, tiges) et intervenant dans le recyclage du  $\text{NH}_4^+$  au cours d'évènements développementaux particuliers (sénescence) et dans la synthèse de Gln destinée au transport vers les sucs phloémiens (pour revue voir Bernard et Habash, 2009). Il existe par ailleurs deux isoformes





**Figure 87. Modèle représentant les effets potentiels d'une dérégulation de la biosynthèse du NAD chez le mutant *N57* d'*Arabidopsis thaliana* et ses conséquences sur le métabolisme azoté.** La baisse de la biosynthèse du NAD entraîne en conditions photorespiratoires une accumulation d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et un dérèglement général de l'assimilation des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) associé à un enrichissement en acides aminés riches en azote (Asn et Arg). Les flèches noires indiquent les étapes enzymatiques. Les flèches en pointillés représentent les transports. En rouge figurent les transcrits, activités enzymatiques et métabolites qui augmentent et en vert ceux qui diminuent. Les flèches rouges correspondent à une régulation positive. Le trait vert terminé par une barre indique un possible rétrocontrôle négatif de l'ammonium sur le transporteur NRT2.1. Pour les abréviations, voir dans le texte.

de la GOGAT chez les végétaux: Fd-GOGAT (*GLU1 At5g04140*, *GLU2 At2g41220*) et NADH-GOGAT (*GLT1 At5g53460*), utilisant respectivement la ferrédoxine et le NADH comme donneur d'électrons (Vanoni *et al.*, 2005). Ces isoformes se distinguent également par leur localisation. La Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1) se retrouve dans les plastes et les mitochondries d'organes chlorophylliens, alors que la NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14) se localise plutôt dans les plastes de tissus non-photosynthétiques (racines, tissus foliaires étiolés, cellules compagnes). L'aspect métabolique, structural et régulateur de ces enzymes a été explicité dans une revue de Suzuki et Knaff (2005).

L'intégration des données transcriptomiques, métabolomiques et physiologiques obtenues dans ce chapitre nous permet de discuter le modèle proposé en **Figure 87**.

Chez la lignée *N57*, l'altération de la balance rédox du NAD entraîne une oxydation légère du pool de NAD/P(H). Cette perturbation rédox apparaît lourde de conséquences sur la physiologie de la plante puisqu'elle affecte l'activité de nombreuses enzymes nécessitant les nucléotides à pyridine comme cofacteurs. Notamment, nos résultats montrent qu'un des impacts clé de cette variation rédox est l'altération de l'activité NR, *point d'entrée* du métabolisme azoté. Chez le mutant, la capacité NR est augmentée, ce qui conduit à une déplétion relative du pool de nitrates. Les analyses  $\delta^{15}\text{N}$  confirment un flux stimulé chez la lignée *N57* pouvant expliquer la déplétion du pool de nitrates. L'augmentation d'activité NR extractible mesurée chez ces mutants n'est pourtant pas corrélée à une induction des transcrits NR, bien au contraire. Cette observation n'est pas surprenante compte tenu des divers niveaux de régulation qui portent sur cette étape enzymatique. A titre d'exemple, une augmentation très forte des transcrits NR chez le mutant *nadk2*, qui s'accompagne d'un enrichissement en nitrates, ne produit aucune modification sur les niveaux d'activités NR (Takahashi *et al.*, 2009). Concernant le surexprimeur *Q5*, une observation similaire est faite puisque la baisse des niveaux de transcrits NR ne s'accompagne pas d'une modification des teneurs en NR mesurées par l'activité extractible.

Les gènes *NRT1* et *NRT2* sont régulés par les nitrates chez de nombreuses espèces. Chez *Arabidopsis thaliana*, de faibles concentrations en  $\text{NO}_3^-$  induisent l'expression



d'*AtNRT2.1*, en accord avec son rôle dans le transport à haute-affinité (Filleur et Daniel-Vedele, 1999). L'assimilation de l'azote subit également un rétrocontrôle négatif exercé par le statut azoté interne de la plante. L'ammonium, la Gln ou d'autres acides aminés importants pour le développement des plantes peuvent ainsi inhiber l'expression des gènes *NRT2* chez *Arabidopsis thaliana* et l'orge (Zhuo *et al.*, 1999 ; Vidmar *et al.*, 2000). En outre, les gènes *AMT* sont également induits à la lumière par le métabolisme carboné et la carence azotée (Lejay *et al.*, 2003 ; Loqué *et al.*, 2005 ; 2006). Par exemple, *AtAMT1.1*, qui code un transporteur d'ammonium à haute affinité, est responsable de l'assimilation du  $\text{NH}_4^+$  lors d'un stress nutritionnel azoté (Gazzarrini *et al.*, 1999 ; Orsel *et al.*, 2002). Chez le mutant *N57*, la baisse du pool de nitrates pourrait être à l'origine de l'activation transcriptionnelle de gènes *AtNRT1.1*, *AtNRT2.7* et *AtAMT1.1*. La baisse du pool de Gln pourrait également ôter la répression exercée par cet acide aminé sur le transport de l'ammonium (Glass *et al.*, 2002). En revanche, *AtNRT2.1* est sous-régulé chez *N57*. Ce phénomène peut s'expliquer par un rétrocontrôle négatif d'un pool augmenté de  $\text{NH}_4^+$  qui inhiberait ainsi l'expression d'*AtNRT2.1*. L'induction des transporteurs de nitrates et d'ammonium foliaires reflète probablement une remobilisation intracellulaire et intratissulaire au sein des feuilles des plantes mutantes. Chez le surexprimeur *Q5*, une même corrélation est observée entre la baisse des teneurs en nitrates et l'induction des transporteurs de nitrates. Cependant, on n'observe pas d'augmentation de l'activité NR extractible qui pourrait expliquer la diminution du pool de nitrates. Chez le surexprimeur, la déplétion relative en nitrates pourrait résulter de l'activation de la NR par l'augmentation des teneurs en NADH cytosoliques. En effet, on constate une stimulation du flux d'incorporation d'azote par ces plantes. Egalement, les teneurs en ammonium sont légèrement augmentées, ce qui corrobore notre hypothèse.

Par ailleurs, l'accumulation de  $\text{NH}_4^+$  chez le mutant *N57* peut provenir d'une conversion Gly-Ser augmentée, comme le suppose la chute du rapport Gly/Ser. Cette conversion implique l'activité de la glycine décarboxylase (GDC, EC 14.4.2) et de la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT, EC 2.1.2.1). La GDC est en réalité un complexe multiprotéique localisé dans la matrice mitochondriale et constitué de quatre protéines : P, H, T et L (Douce *et al.*, 2001). Le clivage de la Gly est réalisé de concert avec les différents



éléments du complexe. Dans un premier temps, une décarboxylation oxydative et une déamination de la Gly aboutissent à la formation de  $\text{CO}_2$ , de  $\text{NH}_4^+$  et la réduction concomitante du  $\text{NAD}^+$  en NADH. Le carbone restant est transféré dans un second temps au tétrahydrofolate (THF) pour former du  $\text{CH}_2\text{-THF}$  qui réagira avec une seconde molécule de Gly pour produire de la Ser *via* la SHMT. La conversion Gly-Ser est ainsi liée à la réduction du  $\text{NAD}^+$  et dans un contexte où le rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  est augmenté, la production de  $\text{NH}_4^+$  photorespiratoire serait favorisée. C'est peut-être le cas chez le mutant *N57* qui présente un pool de NAD plus oxydé associé à un enrichissement en ammonium. Cette stimulation de l'activité GDC est d'autant plus plausible que l'enzyme est régulée au niveau métabolique par un rétrocontrôle négatif exercé par deux de ses substrats : le NADH et la Ser (Douce et Neuberger, 1989 ; Oliver, 1994 ; Douce *et al.*, 2001). La Ser est un inhibiteur compétitif de la Gly pour la réaction catalysée par la protéine P (Oliver et Raman, 1995). Chez le mutant *N57*, l'absence d'augmentation du pool de Ser empêcherait ce rétrocontrôle. Concernant le NADH, ce coenzyme entre en compétition avec le  $\text{NAD}^+$  au niveau du site actif de la protéine L (Bourguignon *et al.*, 1988). Douce *et al.* (2001) suggèrent même qu'un rapport  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  important aurait pour conséquence une augmentation logarithmique de l'inhibition de la GDC. Par extrapolation, un rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  élevé induirait l'activité GDC chez le mutant *N57*. Les teneurs en  $\text{NH}_4^+$  mesurées dans ces plantes sont telles que l'origine photorespiratoire semble hautement probable. Dans ce cas elle masque une éventuelle augmentation d'ammonium issu de l'assimilation primaire de l'azote. En effet, le flux métabolique photorespiratoire est de 10 à 20 fois plus élevé que celui de l'assimilation primaire de l'azote (Keys *et al.* 1978 ; Rachmilevitch *et al.*, 2004 ; Calvin, 1990). *A contrario*, la légère augmentation des teneurs en  $\text{NH}_4^+$  observée chez le surexprimeur *Q5* ne résulterait que de la stimulation de la réduction des nitrates par l'augmentation du NADH.

La plus faible croissance du mutant *N57* pourrait résulter d'une toxicité de l'ammonium qui augmente la respiration cellulaire et la surconsommation de molécules carbonées (Escobar *et al.*, 2006). Une situation similaire est observée chez des mutants d'*Arabidopsis thaliana* *gln1;2* (Lothier *et al.*, 2011) ainsi que chez le mutant *CMSII* du complexe I mitochondrial de tabac (Dutilleul *et al.*, 2005). Chez ces plantes, on remarque une



surexpression des oxydases alternes qui contribuent à l'accélération de la respiration cellulaire (Dutilleul *et al.*, 2005 ; Lothier *et al.*, 2011).

Quelle que soit l'origine du  $\text{NH}_4^+$ , son assimilation dépend du cycle GS/GOGAT. Une suraccumulation d'ammonium chez le mutant *N57* affecterait ce cycle qui semble stimulé au niveau transcriptionnel, comme le révèle l'augmentation des transcrits codant la GS2 et les différentes isoformes de GOGAT. En parallèle, les rapports clé d'acides aminés impliqués dans le métabolisme photorespiratoire sont altérés en raison d'une diminution de la Gln. Le rôle de la Gln dans le métabolisme C/N est encore sujet à controverse, mais plusieurs éléments bibliographiques suggèrent que cet acide aminé réprime directement ou indirectement l'étape de réduction des nitrates catalysée par la NR (Vincentz *et al.*, 1993 ; Ferrario-Méry *et al.*, 2001). En effet chez le tabac, l'augmentation des teneurs en Gln est corrélée à une induction des transcrits NR et réciproquement (Scheible *et al.*, 1997a). Nos résultats montrent chez le mutant *N57* une corrélation entre une activité NR exacerbée et des niveaux en Gln faibles.

De surcroît, la perturbation du métabolisme azoté se traduit par un réajustement métabolique vers la synthèse d'Asn, forme de stockage azotée. Dans ce cas, les asparagine synthétases cytosoliques (AS, EC 6.3.5.4), qui catalysent le transfert de l'ATP du groupement amide de la Gln vers une molécule d'Asp pour produire du Glu et de l'Asn, seraient impliquées (Lam *et al.*, 2003). Ces enzymes peuvent également assimiler directement l'ammonium et synthétiser de l'Asn, comme le montrent des expériences de marquage au  $^{15}\text{NH}_4^+$  après blocage de la biosynthèse du glutamate par approche pharmacologique (azaserine) (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). Les substrats physiologiques de l'AS (Asp et Gln) diminuent chez le mutant *N57* et son produit Asn s'accumule (**Figure 87**). Dans un contexte de forte augmentation de  $\text{NH}_4^+$ , il paraît raisonnable de mesurer les activités AS pour déterminer si elles contribuent à cette synthèse augmentée d'Asn. Curieusement, des teneurs élevées en Asn associées à une chute du pool d'Asp ont été observées dans le cas des mutants du complexe I mitochondrial qui présentent des pools anormalement élevés de NAD(H) (Dutilleul *et al.*, 2005). L'implication directe des niveaux de NAD dans la production





d'Asn n'est probablement pas en cause puisque cette étude révèle également une augmentation consécutive des teneurs en ammonium chez les plantes *CMSII*.

L'excès de  $\text{NH}_4^+$  peut être également rédirigé vers la synthèse d'Arg par l'activité de la carbamoylphosphate synthase (CPSase, EC 6.3.5.5/6.3.4.16) qui produit du carbamoylphosphate par fixation d'ammonium libre ou du groupement amide de la Gln (**Figure 87**) (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Cette biosynthèse est réalisée dans le chloroplaste et vraisemblablement dans la mitochondrie (Nunes-nesi *et al.*, 2008). Le carbamoylphosphate est ensuite fixé sur l'ornithine pour former de la citrulline, convertie en présence d'Asp en arginosuccinate qui donne enfin l'Arg (pour revue voir Slocum, 2005). Chez le mutant *N57*, l'Arg s'accumule et l'Orn diminue. L'Arg accumulée est probablement impliquée dans la fixation d'ammonium photorespiratoire. A l'appui de cette hypothèse, le mutant *glu1* présente une forte augmentation des teneurs en Arg qui est réversée par des conditions non photorespiratoires (Potel *et al.*, 2009).

D'autres métabolites voient leurs teneurs modifiées chez les plantes mutantes *N57* mais l'interprétation de ces observations est plus difficile à établir. C'est le cas notamment de la Phe, dont les niveaux augmentent substantiellement, et du g-ABA, précurseur du succinate (Bouché *et al.*, 2003). Pour ce dernier composé, son accumulation pourrait être liée à la diminution des teneurs en NAD chez le mutant *N57* qui affecterait le fonctionnement de la succinate semialdéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.16).

Il est également à noter une baisse des niveaux d'Asp qui s'accompagne d'une diminution de ses dérivés intermédiaires (hSer et Thr) et d'une accumulation de dérivés terminaux des voies de biosynthèse d'acides aminés issus de l'Asp comme la Lys et l'Ile. Ici encore, l'interprétation de ces fluctuations métaboliques reste difficile à établir.

A la différence du mutant *N57*, chez le surexprimeur *Q5* enrichi en NAD/P(H), il n'y a pas de variations notables des teneurs en acides aminés à l'exception peut-être du pool d'hSer.



Les niveaux de sucres et d'acides organiques présentent aussi des variations chez les plantes mutantes *N57* et *Q5*. La forte production de  $\text{NH}_4^+$  peut entraîner une alcalinisation du milieu, phénomène souvent compensé par une production d'acides organiques. De plus, la glycolyse qui se traduit par la réduction de coenzymes s'accompagne d'une oxydation de molécules organiques. On peut dire qu'elle correspond à l'oxydation du glucose en pyruvate. Chez le mutant *N57*, la suraccumulation de  $\text{NH}_4^+$  ne s'accompagne pourtant pas d'une augmentation des acides organiques issus du cycle de Krebs. Bien au contraire, une forte diminution des teneurs en succinate et fumarate est à noter. L'accumulation d'ammonium observée chez le mutant *N57* pourrait résulter d'une faible disponibilité en acides organiques en réponse à la baisse des teneurs en NAD nécessaires à leurs synthèses. L'inverse est observé chez le surexprimeur *Q5* qui accumule préférentiellement le fumarate. Par ailleurs, nous remarquons chez *N57* des niveaux faibles en glucose et pyruvate. Pourtant, la diminution des teneurs en hexoses chez ces plantes ne semble pas associée à des processus photosynthétiques altérés. Chez les bactéries et les levures, la surproduction de NAD conduit à une augmentation des pools d'acides organiques dont le pyruvate (Liu *et al.*, 2006 ; Zhu *et al.*, 2008b ; Zhou *et al.*, 2011). Il semble en effet que l'élévation des teneurs en NAD stimule le fonctionnement d'étapes enzymatiques clé comme celle de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH ou GAPDH, EC 1.2.1.12). Chez le surexprimeur *Q5*, dont les teneurs en nucléotides à pyridine sont augmentées, les pools d'acides organiques le sont également. *A contrario*, chez le mutant *N57*, dont les niveaux de NAD diminuent, le pool d'acides organiques est restreint. Ces observations suggèrent fortement un contrôle de la glycolyse par les teneurs en nucléotides à pyridine dans les plantes. Notons aussi que parmi les acides organiques mesurés, ce sont les pools de succinate et surtout de fumarate qui sont affectés. En effet, il semble que chez *Arabidopsis thaliana*, d'importantes quantités de fumarate soient stockées et que cet acide organique joue un rôle important dans la synthèse des acides aminés (Prachoenwattana *et al.*, 2010).

Les analyses métabolomiques réalisées sur les plantes dérégulées dans leur production de NAD ont permis de mettre en évidence l'origine des perturbations observées de la balance C/N chez ces plantes. Ainsi, lorsque la synthèse de NAD est réduite et le pool de nucléotides à pyridine légèrement oxydé, on observe une *forte* perturbation du



métabolisme azoté, peut-être d'origine photorespiratoire, avec accumulation d'ammonium et d'acides aminés riches en azote, accompagnée d'une baisse du pool de métabolites carbonés précurseurs. A l'inverse, l'augmentation de la production de NAD/P(H) chez les surexprimeur Q5 de la QPT, conduit à une stimulation de la production d'acides organiques et une légère hausse de l'assimilation primaire de l'azote. Dans tous les cas, les paramètres photosynthétiques n'indiquent pas de modification de la fixation de CO<sub>2</sub> par les plantes mutantes. La détermination des paramètres physiologiques photorespiratoires et respiratoires, la mesure d'activités enzymatiques clé (GDC, PEPC, rubisco, etc.) ainsi que le dosage de métabolites d'importance encore non mesurée (intermédiaires de la glycolyse, adénylates) permettra de renforcer les interprétations jusqu'ici énoncées sur les perturbations métaboliques observées.



Conclusion  
générale  
et  
perspectives





## I. Conclusion générale et perspectives : les lignées *nadC*

---

### A. Effets spécifiques du NAD

---

Nos travaux ont permis de développer un système inductible d'enrichissement en NAD en surproduisant la QPT d'*Escherichia coli* chez *Arabidopsis thaliana*. Cette stratégie fut un succès au vu des résultats obtenus en termes d'augmentation de NAD et des conséquences qui en découlent. Nous restons conscients par ailleurs que d'autres étapes réactionnelles dans la voie de biosynthèse puissent être importantes dans le contrôle des teneurs en nucléotides à pyridine chez les plantes. En particulier, l'aspartate oxydase, qui catalyse la première réaction irréversible de biosynthèse du NAD, semble être finement régulée au niveau transcriptionnel, au regard des informations disponibles dans les bases de données (Genevestigator) et de nos analyses réalisées en conditions de stress biotique. Cette étape limitante fait l'objet de travaux ultérieurs menés au laboratoire (thèse de Linda de Bont).

L'enrichissement du pool de NAD chez les disques *nadC* traités au quinolinate à l'obscurité, sans changement apparent de l'état rédox (NAD/NADH), est corrélé à une augmentation consécutive d'un certain nombre de métabolites dont le nicotinate, le xylose et plusieurs acides aminés. Récemment, [Ford et al. \(2010\)](#) ont montré que des composés issus du nicotinate, appelés néonicotinoïdes, exacerbent les réponses de défense végétales dépendantes de la voie SA. De toute évidence, notre étude suggère très fortement que l'effet d'une surproduction de NAD sur la résistance à la bactérie avirulente *AvrRpm1* est due spécifiquement à la hausse des teneurs intracellulaires en NAD, et non pas à l'accumulation d'intermédiaires métaboliques. Plusieurs éléments étayent cette hypothèse.

- Le pool de nicotinate augmente chez les feuilles *Ctrl* incubées ou infiltrées avec du quinolinate, cependant aucune résistance aux agents pathogènes testés n'a été observée.
- Les altérations métaboliques mises en évidence, comme l'augmentation des niveaux d'Asp, Met ou Asn dans les disques *nadC* enrichis en NAD peuvent s'expliquer par des



mécanismes régulateurs bien caractérisés d'enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés (voir Chapitre II et III). Nous reconnaissons néanmoins que les feuilles *Ctrl* traitées au quinolinate présentent une baisse substantielle des pools d'Asp, Asn et Met. Cet effet peut résulter d'une inhibition des aminotransférases provoquée par l'apport de quinolinate. Ce phénomène s'accompagne aussi d'une légère oxydation du glutathion.

- La résistance à l'infection par *Pst-AvrRpm1* n'est pas altérée par le traitement au quinolinate et ce traitement n'entraîne pas de réponse transcriptomique associée aux réactions de défense.
- Les analyses transcriptomiques à large échelle par puces à ADN CATMA se basent sur des signaux différentiels. En d'autres termes, nous avons analysé des comparaisons entre des conditions *nadC* vs *Ctrl*, en présence ou non de quinolinate. Par conséquent, l'analyse obtenue n'est pas influencée par un effet qui pourrait être spécifique au quinolinate ou au nicotinate.
- Enfin, nous avons mis en évidence une corrélation positive très nette entre la résistance à *Pst-AvrRpm1* et l'augmentation des pools de NAD et de SA.

Nous pouvons ainsi avancer que les effets du NAD mis en évidence par l'analyse des lignées *nadC* sont attribués spécifiquement à la surproduction du NAD chez *Arabidopsis thaliana*.

### B. Perspectives au travail réalisé sur les lignées *nadC*

---

La dynamique du métabolisme rédox apparaît bien souvent complexe, comme en témoignent les résultats obtenus dans les feuilles enrichies en NAD (oxydation, induction de gènes rédox, etc.). Afin de mieux appréhender ces perturbations moléculaires lors de la réponse physiologique de résistance à *Pst-AvrRpm1*, il serait pertinent de mesurer les pools de glutathion et d'autres antioxydants au cours de l'infection bactérienne.



L'implication des ROS comme signaux moléculaires dans les interactions plantes-agents pathogènes est bien documentée (Torres *et al.*, 2010). En outre, Zhang *et al.* (2009) ont montré que l'application extracellulaire de nucléotides à pyridine aboutissait à une induction des gènes *PR* qui est indépendante de la bouffée oxydante générée par les NADPH oxydase (NOX) pariétales/membranaires. Une approche génétique en croisant les lignées *nadC* avec les mutants *atrbohD* et *atrbohF* est également envisagée afin de vérifier si les NOX codées par ces deux gènes interviennent dans la résistance consécutive à une surproduction intracellulaire de NAD. Toutefois, ces enzymes ne sont pas la seule source de ROS. Un rôle mineur est généralement attribué aux mitochondries dans la production de ROS au niveau des tissus photosynthétiques (Apel et Hirt, 2004 ; Kuzniak et Skłodowska, 2005 ; Kornas *et al.*, 2010). Des données récentes issues de la littérature laissent penser à une implication conséquente de ces organites dans l'établissement de la bouffée oxydante lors d'interactions incompatibles (Amirsadeghi *et al.*, 2007). C'est pourquoi, dans l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et *Pst-AvrRpm1*, il serait intéressant de déterminer dans quelle mesure les ROS peuvent intervenir dans la résistance observée en réponse à la surproduction de NAD. Pour cela, un dosage colorimétrique du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sera réalisé au cours de l'infection, tout comme une analyse transcriptomique ciblée et biochimique d'enzymes impliquées dans l'homéostasie des ROS mitochondriales (MnSOD), péroxysomales (oxydases voire CAT) ou chloroplastiques (FeSOD) (Gadjev *et al.*, 2008). L'ensemble des nucléotides à pyridine mérite également d'être quantifié au cours de l'infection afin de déterminer si la résistance à *Pst-AvrRpm1* observée peut être due à une perturbation de la balance rédox NAD/P(H).

Plusieurs données nous incitent à investiguer l'implication du NAD dans la signalisation calcique. Le calcium joue un rôle pivot dans l'établissement de la HR (Grant *et al.*, 2000 ; Ali *et al.*, 2007). Par ailleurs, le NAD est un précurseur de molécules impliquées dans la signalisation calcique (Hunt *et al.*, 2004; Pollack *et al.*, 2007) et puisque notre analyse microarray révèle l'induction de gènes liés à la réponse au calcium, nous proposons également d'évaluer dans quelle mesure intervient le calcium dans la résistance des plantes enrichies en NAD par différentes expériences : un dosage des ions Ca<sup>2+</sup> pourra être réalisé dans les conditions où le NAD s'accumule et au cours de l'interaction incompatible. Une approche pharmacologique pourra également être conduite par l'utilisation d'agents chélateurs des cations Ca<sup>2+</sup>, ce qui permet alors de bloquer la signalisation



calcique et investiguer les conséquences physiologiques. Enfin, il faudra développer une technique chromatographique afin de quantifier le pool de cADPR dans les cellules de plantes.

Le système *nadC* de surproduction inductible de NAD *in planta* constitue un outil intéressant pour les physiologistes et en particulier les pathologistes puisqu'il permet d'examiner comment le pool de NAD intervient dans les mécanismes de défenses. Il serait intéressant de croiser les lignées *nadC* avec d'autres plantes transgéniques altérées dans les voies de signalisation SA comme le mutant *npr1* ou encore dans l'homéostasie de cette phytohormone (*sid2*, *sid1-NahG*). Toujours dans un contexte de signalisation, l'étude des lignées *nadC* pourra se poursuivre par la mesure des pools d'autres phytohormones impliquées dans la réponse aux stress, comme le JA, l'ET et l'ABA.

Nous envisageons également de tester d'autres interactions plantes-pathogènes pour savoir si l'effet du NAD sur la résistance à *Pst-AvrRpm1* peut être généralisé à d'autres pathosystèmes. D'une part, il serait intéressant d'analyser le comportement d'autres souches avirulentes de *Pst* chez laquelle la transduction du signal est dépendante de RIN-4 (*Pst-AvrRpt2*) ou indépendante (*Pst-AvrPphB*) (Jones et Dangl, 2006). D'autre part, l'interaction avec *Hyaloperonospora arabidopsidiis* est à envisager dans le cadre d'une interaction incompatible répondant à une reconnaissance gène-pour-gène chez Col0.

Enfin, nous proposons de quantifier les teneurs en nucléotides à pyridine chez des plantes présentant de façon constitutive ou inductible des symptômes de HR, afin de préciser l'implication du NAD dans ces processus cellulaires. Différents outils sont disponibles, notamment le mutant *lsd1* (*lesion simulating disease 1*) qui se caractérise par une propagation accentuée de la HR lors d'infections par des bactéries avirulentes (Dietrich *et al.*, 1997). Les métacaspases AtMC1 et AtMC2, récemment découvertes comme impliquées dans l'établissement de la mort cellulaire programmée, constituent une autre piste pour la mesure des pools de nucléotides à pyridines en conditions modifiées de HR (Coll *et al.*, 2010). Il existe également des systèmes inductibles qui permettent d'induire la HR après traitement à la dexaméthasone. C'est le cas des lignées *dex::AvrRpt2* et *dex::AvrRpm1* (Andersson *et al.*, 2006).





## II. Conclusion générale et perspectives: les lignées N57 et Q5

---

La nécessité d'aborder les conséquences physiologiques d'une manipulation de la production de NAD chez des plantes entières nous a conduits à déréguler la production de QPT endogène chez *Arabidopsis thaliana*. Nos travaux ont permis d'obtenir des plantes aux teneurs en NAD/P(H) constitutivement modifiées et qui permettent de se pencher sur les questions relatives aux métabolismes carboné et azoté.

### A. Une augmentation constitutive modérée des teneurs en NAD

---

L'enrichissement modeste du pool de NAD et de ses dérivés chez les plantes surexprimeuses Q5 ne s'accompagne pas d'un changement apparent de la balance rédox NAD(P)/NAD(P)H. Cette augmentation est bien moins puissante que celle observée dans les lignées *nadC* inductibles au quinolinate, ce qui suggère une limitation de la fourniture en substrats de l'enzyme QPT par les étapes enzymatiques en amont. En particulier, l'aspartate oxydase, qui catalyse la première étape de la voie de biosynthèse du NAD dite *de novo*, pourrait être à l'origine de cette limitation des hausses de NAD dans les plantes surexprimant la QPT. Souvent, la première étape enzymatique des voies de biosynthèse est celle qui exerce le contrôle le plus important sur la production de métabolites. L'aspartate oxydase est en effet sujette à une forte régulation transcriptionnelle. Un rétrocontrôle négatif par le NAD n'est pourtant pas à exclure comme c'est le cas chez les bactéries (Nasu *et al.*, 1982). Il n'en demeure pas moins qu'une augmentation des niveaux de transcrits QPT de l'ordre de 20 fois ne se traduit que par une augmentation de l'activité extractible d'environ 2.4 fois dont résulte un enrichissement de 35 % en NAD. Même si cette augmentation nous paraît faible, elle correspond à ce qui est observé dans des conditions physiologiques au cours du développement des plantes.



### B. Les effets d'une augmentation constitutive du pool de NAD

---

L'augmentation des teneurs en NAD chez les surexprimeurs Q5 ne se traduit pas par des différences morphologiques, développementales ou de croissance des plantes cultivées sur sol. Toutefois, les études portant sur l'architecture racinaire de ces plantes révèlent une plus forte croissance des racines, tant au niveau des racines latérales que de la racine principale. L'augmentation des teneurs en NAD produit donc des plantes qui explorent mieux la rhizosphère, ce qui peut constituer un avantage, particulièrement lorsque les ressources minérales sont limitantes. Cette modification du profil racinaire rend certainement compte de modifications métaboliques influencées par les teneurs en NAD élevées. Il semble ainsi que l'assimilation des nitrates soit améliorée chez ces plantes, puisque la teneur en  $\text{NO}_3^-$  diminue et le  $\text{NH}_4^+$  croît. Ces observations sont corroborées par les analyses isotopiques du  $\delta^{15}\text{N}$ . Une assimilation primaire stimulée de l'azote peut aussi être à l'origine du développement racinaire. Cependant, le profil des acides aminés reste comparable à celui des plantes témoins, du moins dans les feuilles. Les acides aminés, dont l'utilisation primaire est la synthèse des protéines, sont un élément essentiel de la croissance des plantes. Cette constatation peut expliquer une croissance comparable des parties aériennes. On observe par contre une accumulation de certains acides organiques et plus particulièrement le fumarate. Il est probable que l'augmentation du pool de NAD stimule les étapes enzymatiques de la glycolyse et du cycle de Krebs. Ces observations ne résultent pas d'une modification des paramètres physiologiques liés à la photosynthèse. Pour autant, une mesure plus complète des intermédiaires métaboliques du métabolisme carboné et des étapes enzymatiques clé comme la rubisco et la PEPc ainsi qu'une étude plus fine des flux de C et N dans ces plantes permettrait d'enrichir notre modèle de régulation du métabolisme C/N en réponse à l'augmentation des teneurs en nucléotides à pyridine.

### C. Effet d'une diminution de la synthèse *de novo* de NAD

---

Plus encore qu'une augmentation des teneurs en NAD, c'est surtout la diminution de la biosynthèse du dinucléotide qui a des effets *dramatiques* sur le métabolisme et la croissance des plantes. Comme l'illustre le caractère embryo-létal d'un blocage complet de chacune des



enzymes de la voie de biosynthèse *de novo* du NAD (Kato et al., 2006), la diminution pourtant modeste des teneurs en NAD/P(H) exerce un effet très délétère sur la croissance des mutants *QPT N57*. La diminution de l'activité extractible QPT, de l'ordre de 50 %, altère non seulement les niveaux de NAD, mais aussi la balance rédox des nucléotides à pyridine. Cette altération du rapport NAD/NADH ne se traduit pourtant pas par un stress oxydant dont on pourrait avoir trace en mesurant des rapports GSH/GSSG. Bien au contraire, on observe une plus forte réduction du pool de glutathion chez le mutant *N57* qui s'accompagne d'une augmentation des niveaux du tripeptide. Les conséquences métaboliques observées rendent plutôt compte d'une baisse des niveaux ou des flux de néo-synthèse de NAD. L'augmentation des activités NaPT pourrait traduire une stimulation du recyclage du NAD pour compenser la baisse de synthèse *de novo*. Le fait métabolique le plus remarquable chez les plantes ayant moins de NAD néo-synthétisé consiste en une accumulation d'acides aminés riches en azote qui répond à une "explosion" des teneurs en ammonium. Chez les mutants *CMSII* de tabac, qui accumulent du NAD/P(H), une élévation des teneurs en Asn, Arg et ammonium est aussi observée (Dutilleul et al., 2005). Les forts phénotypes de croissance altérée chez ces deux types de mutants résulteraient probablement plus d'une perturbation de la production d'ammonium que d'une modification *stricto sensu* des teneurs en NAD. Notre étude révèle que l'accumulation d'ammonium est probablement d'origine photorespiratoire. La suraccumulation de  $\text{NH}_4^+$  peut provenir d'une stimulation de la GDC par une altération du rapport NAD/NADH comme en témoigne la baisse des niveaux de Gly. L'accumulation d'Arg et d'Asn permettrait de "détoxifier" au moins en partie l'ammonium excédentaire. On peut imaginer par ailleurs que la baisse des niveaux de NAD provoque une moindre fourniture en squelettes carbonés nécessaires à la fixation de  $\text{NH}_4^+$  photorespiratoire. C'est ce qu'atteste la baisse des teneurs en acides organiques et notamment en fumarate et en pyruvate dans les mutants *N57*. Toujours est-il qu'une implication de la photosynthèse reste peu probable dans les phénomènes observés puisque les paramètres photosynthétiques des plantes mutantes sont similaires à ceux de plantes témoins. Par contre, il est fort probable que la respiration mitochondriale soit stimulée, détournant les molécules carbonées destinées à la croissance des plantes. Comme cité ci-dessus, concernant le surexprimeur *Q5* de la QPT, d'autres paramètres transcriptionnels, métaboliques mais surtout physiologiques, comme par exemple la mesure de la photorespiration, seront nécessaires pour compléter cette étude.



#### D. Perspectives

---

Nous avons vu au cours de ces travaux que la dérégulation de la production de NAD, qu'elle soit inductible, ou constitutive, affecte de façon remarquable le métabolisme des plantes et leur croissance, en particulier leur métabolisme primaire. Vu le rôle central exercé par les nucléotides à pyridine dans la transduction d'énergie cellulaire et en temps que cofacteur de nombreux processus métaboliques, on pouvait s'y attendre. Notre démarche nous a aussi amené à étudier les conséquences d'une signalisation cellulaire dirigée par le NAD et qui semble partie prenante du métabolisme secondaire et des réactions de défense des plantes. Sur ce point, les travaux devront être poursuivis en système inductible comme en système constitutif afin d'élucider les modes d'actions précis du NAD dans les réactions de défense face à différentes classes de pathogènes et de ravageurs. On sait aussi que le NAD est impliqué dans la résistance aux stress abiotiques en participant à des mécanismes de protection cellulaire, ciblant notamment l'ADN, et qui entraînent aussi des conséquences rédox et énergétiques (thiols et adénylates). Dans ce contexte, le croisement de nos lignées transgéniques avec des mutants *parp* et *sirtuine* est envisagé. Enfin, une analyse transcriptomique des plantes aux teneurs en NAD constitutivement modifiées sera prochainement réalisée, laquelle pourra nous aider à dresser des hypothèses ou confirmer celles établies par les travaux menés jusqu'alors.

Le premier travail réalisé avec les plantes *nadC* fait l'objet d'une publication resoumise à *The Plant Journal* après avoir apporté quelques compléments à la demande des réviseurs. Cette thèse fait également l'objet d'une revue en cours de finition. Quant aux travaux portant sur les lignées *N57* et *Q5*, ils seront présentés à la communauté scientifique une fois l'ensemble des analyses finalisées.





# Références bibliographiques



- Aarhus, R., Graeff, R. M., Dickey, D. M., Walseth, T. F., & Lee, H. C. 1995. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 30327-30333.
- Achard, P., Renou, J.-P., Berthomé, R., Harberd, N. P., & Genschik, P. 2008. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology: CB*, **18**, 656-660.
- Adams-Phillips, L., Briggs, A. G., & Bent, A. F. 2010. Disruption of poly(ADP-ribosyl)ation mechanisms alters responses of Arabidopsis to biotic stress. *Plant Physiology*, **152**, 267-280.
- Agledal, L., Niere, M., & Ziegler, M. 2010. The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, **15**, 2-10.
- Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., Tsalas, D., Leng, Q., von Bodman, S., & Berkowitz, G. A. 2007. Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *The Plant Cell*, **19**, 1081-1095.
- Allan, E., & Trewavas, A. 1985. Quantitative changes in calmodulin and NAD kinase during early cell development in the root apex of *Pisum sativum* L. *Planta*, **165**, 493-501.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C., & Ecker, J. R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science (New York, N.Y.)*, **301**, 653-657.
- Amirsadeghi, S., Robson, C. A., & Vanlerberghe, G. C. 2007. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress. *Physiologia Plantarum*, **129**, 253-266.
- Amor, Y., Babiychuk, E., Inzé, D., & Levine, A. 1998. The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the oxidative stress responses in plants. *FEBS Letters*, **440**, 1-7.
- Andersson, M. X., Kourtchenko, O., Dangl, J. L., Mackey, D., & Ellerström, M. 2006. Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **47**, 947-959.
- Apel, K., & Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 373-399.
- Argueso, C. T., Ferreira, F. J., & Kieber, J. J. 2009. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell & Environment*, **32**, 1147-1160.
- Ashihara, H., Luit, B., Belmonte, M., & Stasolla, C. 2008. Metabolism of nicotinamide, adenine and inosine in developing microspore-derived canola (*Brassica napus*) embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 752-759.
- Ashihara, H., Stasolla, C., Yin, Y., Loukanina, N., & Thorpe, T. A. 2005. De novo and salvage biosynthetic pathways of pyridine nucleotides and nicotinic acid conjugates in cultured plant cells. *Plant Science*, **169**, 107-114.
- Ashihara, H., Yin, Y., Deng, W.-W., & Watanabe, S. 2010. Pyridine salvage and nicotinic acid conjugate synthesis in leaves of mangrove species. *Phytochemistry*, **71**, 47-53.
- Axelrod, A. E., Madden, R. J., & Elvehjem, C. A. 1939. The effect of a nicotinic acid deficiency upon the coenzyme I content of animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **131**, 85-93.

- Bachmann, M., McMichael, R. W., Jr, Huber, J. L., Kaiser, W. M., & Huber, S. C. 1995. Partial Purification and Characterization of a Calcium-Dependent Protein Kinase and an Inhibitor Protein Required for Inactivation of Spinach Leaf Nitrate Reductase. *Plant Physiology*, **108**, 1083-1091.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., & Corbineau, F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, **331**, 806-814.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., & Come, D. 1996. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*, **97**, 104-110.
- Bartsch, M., Bednarek, P., Vivancos, P. D., Schneider, B., von Roepenack-Lahaye, E., Foyer, C. H., Kombrink, E., Scheel, D., & Parker, J. E. 2010. Accumulation of isochlorogenic acid-derived 2,3-dihydroxybenzoic 3-O-beta-D-xyloside in Arabidopsis resistance to pathogens and ageing of leaves. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 25654-25665.
- Bartsch, M., Gobbato, E., Bednarek, P., Debey, S., Schultze, J. L., Bautor, J., & Parker, J. E. 2006. Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in Arabidopsis immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the Nudix hydrolase NUDT7. *The Plant Cell*, **18**, 1038-1051.
- Bathellier, C., Tcherkez, G., Mauve, C., Bligny, R., Gout, E., & Ghashghaie, J. 2009. On the resilience of nitrogen assimilation by intact roots under starvation, as revealed by isotopic and metabolomic techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **23**, 2847-2856.
- Bednarek, P., Schneider, B., Svatos, A., Oldham, N. J., & Hahlbrock, K. 2005. Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in Arabidopsis roots. *Plant Physiology*, **138**, 1058-1070.
- Begley, T. P., Kinsland, C., Mehl, R. A., Osterman, A., & Dorrestein, P. 2001. The biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotides in bacteria. *Vitamins and Hormones*, **61**, 103-119.
- Belenky, P., Bogan, K. L., & Brenner, C. 2007. NAD<sup>+</sup> metabolism in health and disease. *Trends in biochemical sciences*, **32**, 12-19.
- Bello, Z., & Grubmeyer, C. 2010. Roles for cationic residues at the quinolinic acid binding site of quinolinate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, **49**, 1388-1395.
- Berger, F. 2004. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends in Biochemical Sciences*, **29**, 111-118.
- Berger, F., Ramírez-Hernández, M. H., & Ziegler, M. 2004. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends in Biochemical Sciences*, **29**, 111-118.
- Berger, S., Sinha, A. K., & Roitsch, T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 4019-4026.
- Bernard, S. M., & Habash, D. Z. 2009. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *The New Phytologist*, **182**, 608-620.
- Berrin, J.-G., Pierrugues, O., Brutescio, C., Alonso, B., Montillet, J.-L., Roby, D., & Kazmaier, M. 2005. Stress induces the expression of AtNADK-1, a gene encoding a NAD(H) kinase in Arabidopsis thaliana. *Molecular Genetics and Genomics*, **273**, 10-19.
- Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., Taconnat, L., Renou, J.-P., Pugin, A., & Wendehenne, D. 2009. Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in Arabidopsis by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology*, **149**, 1302-1315.
- Bewley, J. D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, **9**, 1055-1066.

- Bhatia, R., & Calvo, K. C.** 1996. The sequencing expression, purification, and steady-state kinetic analysis of quinolinate phosphoribosyl transferase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **325**, 270-278.
- Bieganowski, P., & Brenner, C.** 2004. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD<sup>+</sup> in fungi and humans. *Cell*, **117**, 495-502.
- Blander, G., & Guarente, L.** 2004. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual Review of Biochemistry*, **73**, 417-435.
- Blickling, S., & Knäblein, J.** 1997. Feedback inhibition of dihydrodipicolinate synthase enzymes by L-lysine. *Biological Chemistry*, **378**, 207-210.
- Blinova, K., Levine, R. L., Boja, E. S., Griffiths, G. L., Shi, Z.-D., Ruddy, B., & Balaban, R. S.** 2008. Mitochondrial NADH fluorescence is enhanced by complex I binding. *Biochemistry*, **47**, 9636-9645.
- Bloom, A. J., Burger, M., Rubio Asensio, J. S., & Cousins, A. B.** 2010. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)*, **328**, 899-903.
- Boatright, K. M., & Salvesen, G. S.** 2003. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 725-731.
- Bonzon, M., Simon, P., Greppin, H., & Wagner, E.** 1983. Pyridine nucleotides and redox-charge evolution during the induction of flowering in spinach leaves. *Planta*, **159**, 254-260.
- Bouché, N., Lacombe, B., & Fromm, H.** 2003. GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends in cell biology*, **13**, 607-610.
- Bourguignon, J., Neuburger, M., & Douce, R.** 1988. Resolution and characterization of the glycine-cleavage reaction in pea leaf mitochondria. Properties of the forward reaction catalysed by glycine decarboxylase and serine hydroxymethyltransferase. *The Biochemical Journal*, **255**, 169-178.
- Bouteau, H. E.-M., Job, C., Job, D., Corbineau, F., & Bailly, C.** 2007. ROS Signaling in Seed Dormancy Alleviation. *Plant Signaling & Behavior*, **2**, 362-364.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brady, N., & Weil, R. R.** 1999. *The nature and properties of soils*. 12<sup>e</sup> edn. Upper Saddle River N.J.: Prentice Hall.
- Brenner, C.** 2005. Evolution of NAD biosynthetic enzymes. *Structure (London, England: 1993)*, **13**, 1239-1240.
- Broekaert, W. F., Delauré, S. L., De Bolle, M. F. C., & Cammue, B. P. A.** 2006. The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 393-416.
- Bykova, N. V., & Møller, I. M.** 2001. Involvement of matrix NADP turnover in the oxidation of NAD-linked substrates by pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum*, **111**, 448-456.
- Caboche, M., & Rouzé, P.** 1990. Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends in Genetics: TIG*, **6**, 187-192.
- Caito, S., Hwang, J.-woong, Chung, S., Yao, H., Sundar, I. K., & Rahman, I.** 2010. PARP-1 inhibition does not restore oxidant-mediated reduction in SIRT1 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **392**, 264-270.
- Cane, K. A., Mayer, M., Lidgett, A. J., Michael, A. J., & Hamill, J. D.** 2005. Molecular analysis of alkaloid metabolism in *AABB* v. *aabb* genotype *Nicotiana tabacum* in response to wounding of aerial tissues and methyl jasmonate treatment of cultured roots. *Functional Plant Biology*, **32**, 305.

- Canvin, D. T.** 1990. Photorespiration and CO<sub>2</sub>-concentrating mechanisms. *In*: Dennis, D. T. & Turpin D. H., Editors, *Plant Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*, Langman Scientific-Technical Press, Singapore, 253–273.
- Cárdenas, L., McKenna, S. T., Kunkel, J. G., & Hepler, P. K.** 2006. NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth. *Plant Physiology*, **142**, 1460-1468.
- Chai, M.-F., Chen, Q.-J., An, R., Chen, Y.-M., Chen, J., & Wang, X.-C.** 2005. NADK2, an Arabidopsis chloroplastic NAD kinase, plays a vital role in both chlorophyll synthesis and chloroplast protection. *Plant Molecular Biology*, **59**, 553-564.
- Chai, M.-F., Wei, P.-C., Chen, Q.-J., An, R., Chen, J., Yang, S., & Wang, X.-C.** 2006. NADK3, a novel cytoplasmic source of NADPH, is required under conditions of oxidative stress and modulates abscisic acid responses in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **47**, 665-674.
- Chapman, N., Whalley, W. R., Lindsey, K., & Miller, A. J.** 2011. Water supply and not nitrate concentration determines primary root growth in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*,
- Chappie, J. S., Cànaves, J. M., Han, G. W., Rife, C. L., Xu, Q., & Stevens, R. C.** 2005. The structure of a eukaryotic nicotinic acid phosphoribosyltransferase reveals structural heterogeneity among type II PRTases. *Structure (London, England: 1993)*, **13**, 1385-1396.
- Cheng, C. L., Acedo, G. N., Dewdney, J., Goodman, H. M., & Conkling, M. A.** 1991. Differential expression of the two Arabidopsis nitrate reductase genes. *Plant Physiology*, **96**, 275-279.
- Cheng, C. L., Dewdney, J., Nam, H. G., den Boer, B. G., & Goodman, H. M.** 1988. A new locus (NIA 1) in Arabidopsis thaliana encoding nitrate reductase. *The EMBO Journal*, **7**, 3309-3314.
- Chini, E. N., Chini, C. C. S., Kato, I., Takasawa, S., & Okamoto, H.** 2002. CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. *The Biochemical Journal*, **362**, 125-130.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J.** 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**, 803-814.
- Chopin, F., Wirth, J., Dorbe, M. F., Lejay, L., Krapp, A., Gojon, A., & Daniel-Vedele, F.** 2007a. The Arabidopsis nitrate transporter AtNRT2. 1 is targeted to the root plasma membrane. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**, 630–635.
- Chopin, F., Orsel, M., Dorbe, M.-F., Chardon, F., Truong, H.-N., Miller, A. J., Krapp, A., & Daniel-Vedele, F.** 2007b. The Arabidopsis ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *The Plant Cell*, **19**, 1590-1602.
- Cicchillo, R. M., Tu, L., Stromberg, J. A., Hoffart, L. M., Krebs, C., & Booker, S. J.** 2005. Escherichia coli quinolinate synthetase does indeed harbor a [4Fe-4S] cluster. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 7310-7311.
- Clough, S. J., & Bent, A. F.** 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **16**, 735-743.
- Colabroy, K. L., & Begley, T. P.** 2005. The pyridine ring of NAD is formed by a nonenzymatic pericyclic reaction. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 840-841.
- Collins, P. B., & Chaykin, S.** 1972. The management of nicotinamide and nicotinic acid in the mouse. *The Journal of Biological Chemistry*, **247**, 778-783.
- Coll, N. S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J. L., & Epple, P.** 2010. Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science (New York, N.Y.)*, **330**, 1393-1397.

- Comings, D. E., Muhleman, D., Dietz, G., Sherman, M., & Forest, G. L.** 1995. Sequence of human tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2): presence of a glucocorticoid response-like element composed of a GTT repeat and an intronic CCCCT repeat. *Genomics*, **29**, 390-396.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Sandalio, L. M., Distefano, S., Palma, J. M., Lupiáñez, J. A., & Del Río, L. A.** 1998. A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *The Biochemical Journal*, **330 (Pt 2)**, 777-784.
- Coruzzi, G. M., & Zhou, L.** 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging « matrix effects ». *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 247-253.
- Crawford, N. M., & Forde, B. G.** 2002. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. In: E Meyerowitz, C Somerville, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville
- Crawford, N. M., Kahn, M. L., Leustek, T., & Long, S. R.** 2000. Nitrogen and Sulfur. In : *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R. (eds). Rockville : American Society of Plant Physiologists, 786-849.
- Cuevas, E., Lantz, S., Newport, G., Divine, B., Wu, Q., Paule, M. G., Tobón-Velasco, J. C., Ali, S. F., & Santamaría, A.** 2010. On the early toxic effect of quinolinic acid: Involvement of RAGE. *Neuroscience Letters*, **474**, 74-78.
- Curien, G., Laurencin, M., Robert-Genthon, M., & Dumas, R.** 2007. Allosteric monofunctional aspartate kinases from Arabidopsis. *The FEBS Journal*, **274**, 164-176.
- Dahmen, W., Webb, B., & Preiss, J.** 1967. The deamido-diphosphopyridine nucleotide and diphosphopyridine nucleotide pyrophosphorylases of Escherichia coli and yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **120**, 440-450.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A., & Richberg, M. H.** 1996. Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *The Plant Cell*, **8**, 1793-1807.
- Daniel-Vedele, F., & Caboche M.** 1996. Molecular analysis of nitrate assimilation on high plants. *Crompte Rendu de l'Académie des Sciences III: Sciences de la Vie*, **319**, 961-968.
- Danø, S., Sørensen, P. G., & Hynne, F.** 1999. Sustained oscillations in living cells. *Nature*, **402**, 320-322.
- Davies, M.J.** 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1703**, 93-109.
- Debeaujon, I., & Koornneef, M.** 2000. Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology*, **122**, 415-424.
- Dechorgnat, J., Nguyen, C. T., Armengaud, P., Jossier, M., Diatloff, E., Filleur, S., & Daniel-Vedele, F.** 2011. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 1349-1359.
- Delaney, T. P., Friedrich, L., & Ryals, J. A.** 1995. Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 6602-6606.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., & Ryals, J.** 1994. A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science (New York, N.Y.)*, **266**, 1247-1250.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., & Lamb, C.** 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, **394**, 585-588.



- Desveaux, D., Subramaniam, R., Després, C., Mess, J.-N., Lévesque, C., Fobert, P. R., Dangl, J. L., & Brisson, N. 2004. A « Whirly » transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. *Developmental Cell*, **6**, 229-240.
- Diefenbach, J., & Bürkle, A. 2005. Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, **62**, 721-730.
- Dieter, P., & Marmé, D. 1984. A Ca<sup>2+</sup>, Calmodulin-dependent NAD kinase from corn is located in the outer mitochondrial membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, **259**, 184-189.
- Dietrich, L. S., Fuller, L., Yero, I. L., & Martinez, L. 1966. Nicotinamide mononucleotide pyrophosphorylase activity in animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, **241**, 188-191.
- Dietrich, R. A., Richberg, M. H., Schmidt, R., Dean, C., & Dangl, J. L. 1997. A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*, **88**, 685-694.
- Djebbar, R., Rzigui, T., Pétriacq, P., Mauve, C., Priault, P., Fresneau, C., De Paepe, M., Florez-Sarasa, I., Benhassaine-Kesri, G., Streb, Gakère, B., Cornic, G., & De Paepe, R. soumis. Respiratory complex I deficiency induces drought tolerance by impacting leaf stomatal and hydraulic conductances. *Planta*.
- Dong, X. 2004. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 547-552.
- Doucet-Chabeaud, G., Godon, C., Brutesco, C., de Murcia, G., & Kazmaier, M. 2001. Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, **265**, 954-963.
- Douce, R., & Neuburger, M. 1989. The Uniqueness of Plant Mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**, 371-414.
- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M., & Rébeillé, F. 2001. The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science*, **6**, 167-176.
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. 1988. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, **16**, 6127-6145.
- Dunn, G. E., Lee, G. K. J., & Thimm, H. 1972. Kinetics and Mechanism of Decarboxylation of some Pyridinecarboxylic Acids in Aqueous Solution. *Canadian Journal of Chemistry*, **50**, 3017-3027.
- Durner, J., Wendehenne, D., & Klessig, D. F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 10328-10333.
- Durrant, W. E., & Dong, X. 2004. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology*, **42**, 185-209.
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chétrit, P., Foyer, C. H., & De Paepe, R. 2003. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *The Plant Cell Online*, **15**, 1212.
- Dutilleul, C., Lelarge, C., Prioul, J.-L., De Paepe, R., Foyer, C. H., & 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 Physiology*, **139**, 64-78.
- Du, X., Wang, W., Kim, R., Yakota, H., Nguyen, H., & Kim, S. H. 2001. Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*, **40**, 14166-14172.
- Eads, J. C., Ozturk, D., Wexler, T. B., Grubmeyer, C., & Sacchettini, J. C. 1997. A new function for a common fold: the crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Structure (London, England: 1993)*, **5**, 47-58.

- Elliott, P. J., & Jirousek, M.** 2008. Sirtuins: novel targets for metabolic disease. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, **9**, 371-378.
- Elvehjem, C. A., Madden, R. J., & Woolley, D. W.** 1938. The isolation and identification of the anti-black tongue factor. *Journal of Biological Chemistry*, 137-49.
- Emanuelli, M., Carnevali, F., Lorenzi, M., Raffaelli, N., Amici, A., Ruggieri, S., & Magni, G.** 1999. Identification and characterization of YLR328W, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding NMN adenyllyltransferase. Expression and characterization of the recombinant enzyme. *FEBS Letters*, **455**, 13-17.
- Emanuelli, M., Carnevali, F., Saccucci, F., Pierella, F., Amici, A., Raffaelli, N., & Magni, G.** 2001. Molecular cloning, chromosomal localization, tissue mRNA levels, bacterial expression, and enzymatic properties of human NMN adenyllyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 406-412.
- Escobar, M. A., Geisler, D. A., & Rasmusson, A. G.** 2006. Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. *The Plant Journal*, **45**, 775-788.
- von Euler, H.** 1930. Fermentation of sugars and fermentative enzymes. *Chemistry, 1922-1941*, **2**, 144.
- Evans, A. M., Wyatt, C. N., Kinnear, N. P., Clark, J. H., & Blanco, E. A.** 2005. Pyridine nucleotides and calcium signalling in arterial smooth muscle: from cell physiology to pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, **107**, 286-313.
- Fahey, R. C., & Newton, G. L.** 1987. Determination of low-molecular-weight thiols using monobromobimane fluorescent labeling and high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology*, **143**, 85-96.
- Fan, W., & Dong, X.** 2002. In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **14**, 1377-1389.
- Farmer, E. E., & Ryan, C. A.** 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 7713-7716.
- Ferrario-Méry, S., Masclaux, C., Suzuki, A., Valadier, M. H., Hirel, B., & Foyer, C. H.** 2001. Glutamine and alpha-ketoglutarate are metabolite signals involved in nitrate reductase gene transcription in untransformed and transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-glutamine-alpha-ketoglutarate aminotransferase. *Planta*, **213**, 265-271.
- Feth, F., Wagner, R., & Wagner, K. G.** 1986. Regulation in tobacco callus of enzyme activities of the nicotine pathway. *Planta*, **168**, 402-407.
- Filleur, S., & Daniel-Vedele, F.** 1999. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta*, **207**, 461-469.
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G.** 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, **171**, 501-523.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J.** 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239-247.
- Fjeld, C. C., Birdsong, W. T., & Goodman, R. H.** 2003. Differential binding of NAD<sup>+</sup> and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 9202-9207.
- Flor, H. H.** 1955. Host-Parasite Interaction in Flax Rust - its Genetics and Other Implications. *Phytopathology*, **45**, 680-685.
- Flor, H. H.** 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**, 275-296.

- Forde, B. G. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1465**, 219-235.
- Forde, B. G., & Lea, P. J. 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 2339-2358.
- Ford, K. A., Casida, J. E., Chandran, D., Gulevich, A. G., Okrent, R. A., Durkin, K. A., Sarpong, R., Bunnelle, E. M., & Wildermuth, M. C. 2010. Neonicotinoid insecticides induce salicylate-associated plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 17527-17532.
- Ford, K. A., & Casida, J. E. 2008. Comparative Metabolism and Pharmacokinetics of Seven Neonicotinoid Insecticides in Spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 10168-10175.
- Forouhar, F., Anderson, J. L. R., Mowat, C. G., Vorobiev, S. M., Hussain, A., Abashidze, M., Bruckmann, C., Thackray, S. J., Seetharaman, J., Tucker, T., Xiao, R., Ma, L.-C., Zhao, L., Acton, T. B., Montelione, G. T., Chapman, S. K., & Tong, L. 2007. Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 473-478.
- Foster, A. C., Zinkand, W. C., & Schwarcz, R. 1985. Quinolinic acid phosphoribosyltransferase in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, **44**, 446-454.
- Foster, J. W., & Moat, A. G. 1978. Mapping and characterization of the nad genes in Salmonella typhimurium LT-2. *Journal of Bacteriology*, **133**, 775-779.
- Foster, J. W., & Moat, A. G. 1980. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiological Reviews*, **44**, 83-105.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, **155**, 2.
- Foyer, C. H., Noctor, G., & Hodges, M. 2011. Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *Journal of experimental botany*, **62**, 1467.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. 2003. Foyer, C.H., Noctor, G. (ed.): Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism. *Photosynthetica*, **41**, 342.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, **17**, 1866-1875.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, **11**, 861-905.
- Foyer, C. H., Bloom, A. J., Queval, G., & Noctor, G. 2009. Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, **60**, 455-484.
- Foyer, C., Rowell, J., & Walker, D. 1983. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta*, **157**, 239-244.
- Friedkin, M., & Lehninger, A. L. 1949. Esterification of inorganic phosphate coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, **178**, 611-644.
- Frost, G. M., Yang, K. S., & Waller, G. R. 1967. Nicotinamide adenine dinucleotide as a precursor of nicotine in *Nicotiana rustica* L. *The Journal of Biological Chemistry*, **242**, 887-888.
- Frothingham, R., Meeker-O'Connell, W. A., Talbot, E. A., George, J. W., & Kreuzer, K. N. 1996. Identification, cloning, and expression of the *Escherichia coli* pyrazinamidase and nicotinamidase gene, *pncA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 1426-1431.

- Fukuoka, S., & Shibata, K.** 1999. Characterization and functional expression of the cDNA encoding human brain quinolinate phosphoribosyltransferase. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **467**, 611-614.
- Fukuoka, S. I., Nyaruhucha, C. M., & Shibata, K.** 1998. Characterization and functional expression of the cDNA encoding human brain quinolinate phosphoribosyltransferase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1395**, 192-201.
- Gadjev, I., Stone, J. M., & Gechev, T. S.** 2008. Chapter 3: Programmed Cell Death in Plants New Insights into Redox Regulation and the Role of Hydrogen Peroxide. Dans: *International Review of Cell and Molecular Biology*, **270**, 87-144. Elsevier.
- Gagnot, S., Tamby, J.-P., Martin-Magniette, M.-L., Bitton, F., Tacconat, L., Balzergue, S., Aubourg, S., Renou, J.-P., Lecharny, A., & Brunaud, V.** 2008. CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Research*, **36**, 986-990.
- Gakière, B., Ravanel, S., Droux, M., Douce, R., & Job, D.** 2000. Mechanisms to account for maintenance of the soluble methionine pool in transgenic Arabidopsis plants expressing antisense cystathionine gamma-synthase cDNA. *Comptes Rendus De l'Académie Des Sciences. Série III, Sciences De La Vie*, **323**, 841-851.
- Galili, G., Tang, G., Zhu, X., & Gakiere, B.** 2001. Lysine catabolism: a stress and development super-regulated metabolic pathway. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 261-266.
- Gansel, X., Muñoz, S., Tillard, P., & Gojon, A.** 2001. Differential regulation of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in Arabidopsis: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **26**, 143-155.
- De Gara, L., Locato, V., Dipierro, S., & de Pinto, M. C.** 2010. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production ☆. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, **173**, S13-S19.
- Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W. B., & von Wirén, N.** 1999. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. *The Plant Cell*, **11**, 937-948.
- Ge, X., Li, G.-J., Wang, S.-B., Zhu, H., Zhu, T., Wang, X., & Xia, Y.** 2007. AtNUDT7, a Negative Regulator of Basal Immunity in Arabidopsis, Modulates Two Distinct Defense Response Pathways and Is Involved in Maintaining Redox Homeostasis. *Plant Physiology*, **145**, 204-215.
- Ge, Y., Dudoit, S., & Speed, T. P.** 2003. Resampling-based multiple testing for microarray data analysis. *Test*, **12**, 1-77.
- Ghislain, M., Talla, E., & François, J. M.** 2002. Identification and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamidase gene, PNC1. *Yeast (Chichester, England)*, **19**, 215-224.
- Ghosh, A., & Chance, B.** 1964. Oscillations of glycolytic intermediates in yeast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **16**, 174-181.
- Glass, A. D. M., Britto, D. T., Kaiser, B. N., Kinghorn, J. R., Kronzucker, H. J., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M. Y., Unkles, S. E., & Vidmar, J. J.** 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 855-864.
- Glazebrook, J.** 1999. Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**, 280-286.
- Glazebrook, J., & Ausubel, F. M.** 1994. Isolation of phytoalexin-deficient mutants of Arabidopsis thaliana and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 8955-8959.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.-S., Nawrath, C., Métraux, J.-P., Zhu, T., & Katagiri, F.** 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **34**, 217-228.

- Gojon, A., Nacry, P., & Davidian, J. -C. 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 328-338.
- Gómez-Gómez, L. 2004. Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Molecular Immunology*, **41**, 1055-1062.
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Bellés, J. M., Barrero, J. M., Piqueras, P., Ponce, M. R., Micol, J. L., Serrano, R., & Rodríguez, P. L. 2002. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *The Plant Cell*, **14**, 1833-1846.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., & Mansfield, J. 2000. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **23**, 441-450.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, **32**, 481.
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., & Estelle, M. 2001. Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, **414**, 271-276.
- Graziani, G., & Szabó, C. 2005. Clinical perspectives of PARP inhibitors. *Pharmacological Research*, **52**, 109-118.
- Griffith, G. R., Chandler, J. L., & Gholson, R. K. 1975. Studies on the de novo Biosynthesis of NAD in Escherichia coli. *European Journal of Biochemistry*, **54**, 239-245.
- Grose, J. H., Bergthorsson, U., & Roth, J. R. 2005a. Regulation of NAD synthesis by the trifunctional NadR protein of Salmonella enterica. *Journal of Bacteriology*, **187**, 2774-2782.
- Grose, J. H., Bergthorsson, U., Xu, Y., Sternecker, J., Khodaverdian, B., & Roth, J. R. 2005b. Assimilation of nicotinamide mononucleotide requires periplasmic AphA phosphatase in Salmonella enterica. *Journal of Bacteriology*, **187**, 4521-4530.
- Gross, J., Rajavel, M., Segura, E., & Grubmeyer, C. 1996. Energy coupling in Salmonella typhimurium nicotinic acid phosphoribosyltransferase: identification of His-219 as site of phosphorylation. *Biochemistry*, **35**, 3917-3924.
- Grozinger, C. M., Chao, E. D., Blackwell, H. E., Moazed, D., & Schreiber, S. L. 2001. Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 38837-38843.
- Guérard, F., Pétriacq, P., Gakière, B., & Tcherkez, G. 2011. Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the analysis of plant samples: A method for simultaneous screening of common cofactors or nucleotides and application to an engineered plant line. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française De Physiologie Végétale*.
- Guidetti, P., Luthi-Carter, R. E., Augood, S. J., & Schwarcz, R. 2004. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, **17**, 455-461.
- Guo, F. Q., Wang, R., Chen, M., & Crawford, N. M. 2001. The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *The Plant Cell*, **13**, 1761-1777.
- Guo, F. Q., Young, J., & Crawford, N. M. 2003. The nitrate transporter AtNRT1. 1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **15**, 107.
- Guse, A. H. 2002. Cyclic ADP-ribose (cADPR) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP): novel regulators of Ca<sup>2+</sup>-signaling and cell function. *Current Molecular Medicine*, **2**, 273-282.



- Guse, A. H.** 2004a. Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 847-855.
- Guse, A. H.** 2004b. Regulation of calcium signaling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Current Molecular Medicine*, **4**, 239-248.
- Haferkamp, I., Schmitz-Esser, S., Linka, N., Urbany, C., Collingro, A., Wagner, M., Horn, M., & Neuhaus, H. E.** 2004. A candidate NAD<sup>+</sup> transporter in an intracellular bacterial symbiont related to Chlamydiae. *Nature*, **432**, 622-625.
- Hager, J., Pellny, T. K., Mauve, C., Lelarge-Trouverie, C., Paepe, R., Foyer, C. H., & Noctor, G.** 2010. Conditional modulation of NAD levels and metabolite profiles in *Nicotiana glauca* by mitochondrial electron transport and carbon/nitrogen supply. *Planta*, **231**, 1145-1157.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., & Maliga, P.** 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, **25**, 989-994.
- Hanning, I., & Heldt, H. W.** 1993. On the Function of Mitochondrial Metabolism during Photosynthesis in Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaves (Partitioning between Respiration and Export of Redox Equivalents and Precursors for Nitrate Assimilation Products). *Plant Physiology*, **103**, 1147-1154.
- Hara, N., Yamada, K., Shibata, T., Osago, H., Hashimoto, T., & Tsuchiya, M.** 2007. Elevation of Cellular NAD Levels by Nicotinic Acid and Involvement of Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 24574-24582.
- Harden, A., & Young, W.** 1906. The Alcoholic Ferment of Yeast-Juice. *Proceedings of the Royal Society of London*, **78**, 369-375.
- Harman, D.** 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, **11**, 298-300.
- Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C., & Hodge, S.** 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 2122-2127.
- Hashida, S.-n, Itami, T., Takahashi, H., Takahara, K., Nagano, M., Kawai-Yamada, M., Shoji, K., Goto, F., Yoshihara, T., & Uchimiya, H.** 2010. Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 3813-3825.
- Hashida, S.-n, Takahashi, H., & Uchimiya, H.** 2009. The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Annals of Botany*, **103**, 819-824.
- Hashida, S.-nosuke, Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., & Uchimiya, H.** 2007. *Arabidopsis thaliana* nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (AtNMNAT) is required for pollen tube growth. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **49**, 694-703.
- Hayakawa, T., & Iwai, K.** 1984. Effect of tryptophan and/or casein supplementation on NAD levels in livers of the rats fed on niacin- and protein-free diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **30**, 303-306.
- Heber, U. W., & Santarius, K. A.** 1965. Compartmentation and reduction of pyridine nucleotides in relation to photosynthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **109**, 390-408.
- Heck, S., Grau, T., Buchala, A., Métraux, J.-P., & Nawrath, C.** 2003. Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis*-*Pseudomonas syringae* pv. tomato interaction. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **36**, 342-352.

- Herbette, S., Tacconat, L., Hugouvieux, V., Piette, L., Magniette, M. L. M., Cuine, S., Auroy, P., Richaud, P., Forestier, C., Bourguignon, J., & others.** 2006. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie*, **88**, 1751–1765.
- Higuchi, K., & Hayaishi, O.** 1967. Enzymic formation of D-kynurenine from D-tryptophan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **120**, 397-403.
- Hirel, B., & Lea, P. J.** 2002. The biochemistry, molecular biology, and genetic manipulation of primary ammonia assimilation. In: Foyer CH, Noctor G, eds. Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism. *Advances in Photosynthesis Research*, **12**, Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 71–92.
- Hodges, M.** 2002. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 905-916.
- Hoagland, D. R., & Arnon D. I.** 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circ. 347. University of California. Agricultural Experiment Station, Berkley.
- Holfelder, M. G. A. H., Steck, M., Komor, E., & Seifert, K.** 1998. Ricinine in phloem sap of *Ricinus communis*. *Phytochemistry*, **47**, 1461-1463.
- Ho, C. L., Noji, M., Saito, M., & Saito, K.** 1999. Regulation of serine biosynthesis in Arabidopsis. Crucial role of plastidic 3-phosphoglycerate dehydrogenase in non-photosynthetic tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 397-402.
- Ho, C.-H., Lin, S.-H., Hu, H.-C., & Tsay, Y.-F.** 2009. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, **138**, 1184-1194.
- Houtkooper, R. H., Canto, C., Wanders, R. J., & Auwerx, J.** 2009. The Secret Life of NAD<sup>+</sup>: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways. *Endocrine Reviews*, **31**, 194-223.
- Hsu, S. L., & Fahien, L. A.** 1976. Effect of quinolinate on aminotransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **177**, 217-225.
- Huang, L., Sun, Q., Qin, F., Li, C., Zhao, Y., & Zhou, D.-X.** 2007. Down-regulation of a SILENT INFORMATION REGULATOR2-related histone deacetylase gene, OsSRT1, induces DNA fragmentation and cell death in rice. *Plant Physiology*, **144**, 1508-1519.
- Hughes, K. T., Dessen, A., Gray, J. P., & Grubmeyer, C.** 1993. The Salmonella typhimurium nadC gene: sequence determination by use of Mud-P22 and purification of quinolinate phosphoribosyltransferase. *Journal of Bacteriology*, **175**, 479-486.
- Hunt, L., & Gray, J. E.** 2009. The relationship between pyridine nucleotides and seed dormancy. *New Phytologist*, **181**, 62-70.
- Hunt, L., Holdsworth, M. J., & Gray, J. E.** 2007. Nicotinamidase activity is important for germination. *The Plant Journal*, **51**, 341-351.
- Hunt, L., Lerner, F., & Ziegler, M.** 2004. NAD - new roles in signalling and gene regulation in plants. *New Phytologist*, **163**, 31-44.
- Igamberdiev, A. U., & Gardeström, P.** 2003. Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1606**, 117-125.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., & Guarente, L.** 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, **403**, 795-800.

- Imai, S.-I.** 2009. The NAD World: a new systemic regulatory network for metabolism and aging--Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **53**, 65-74.
- Ishidoh, K., Kamemura, N., Imagawa, T., Oda, M., Sakurai, J., & Katunuma, N.** 2010. Quinolinate phosphoribosyl transferase, a key enzyme in de novo NAD<sup>+</sup> synthesis, suppresses spontaneous cell death by inhibiting overproduction of active-caspase-3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1803**, 527-533.
- Iwahashi, Y., & Nakamura, T.** 1989. Localization of the NADH kinase in the inner membrane of yeast mitochondria. *Journal of Biochemistry*, **105**, 916-921.
- Iwahashi, Y., Hitoshio, A., Tajima, N., & Nakamura, T.** 1989. Characterization of NADH kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemistry*, **105**, 588-593.
- Jackson, T. M., Rawling, J. M., Roebuck, B. D., & Kirkland, J. B.** 1995. Large supplements of nicotinic acid and nicotinamide increase tissue NAD<sup>+</sup> and poly(ADP-ribose) levels but do not affect diethylnitrosamine-induced altered hepatic foci in Fischer-344 rats. *The Journal of Nutrition*, **125**, 1455-1461.
- Jamai, A., Salomé, P. A., Schilling, S. H., Weber, A. P. M., & McClung, C. R.** 2009. Arabidopsis photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *The Plant Cell*, **21**, 595-606.
- Jambunathan, N., & Mahalingam, R.** 2006. Analysis of Arabidopsis growth factor gene 1 (GFG1) encoding a nudix hydrolase during oxidative signaling. *Planta*, **224**, 1-11.
- Jambunathan, N., Penaganti, A., Tang, Y., & Mahalingam, R.** 2010. Modulation of redox homeostasis under suboptimal conditions by Arabidopsis nudix hydrolase 7. *BMC Plant Biology*, **10**, 173.
- Jarrett, H. W., Brown, C. J., Black, C. C., & Cormier, M. J.** 1982. Evidence that calmodulin is in the chloroplast of peas and serves a regulatory role in photosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **257**, 13795-13804.
- Johnson, C.** 2003. Salicylic Acid and NPR1 Induce the Recruitment of trans-Activating TGA Factors to a Defense Gene Promoter in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **15**, 1846-1858.
- Jones, D. P.** 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, **295**, C849-868.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L.** 2006. The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., & Greenberg, J. T.** 2009. Priming in Systemic Plant Immunity. *Science*, **324**, 89-91.
- Kaiser, W. M., & Huber, S. C.** 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 1981-1989.
- Kaiser, W. M., Kandlbinder, A., Stoimenova, M., & Glaab, J.** 2000. Discrepancy between nitrate reduction rates in intact leaves and nitrate reductase activity in leaf extracts: what limits nitrate reduction in situ? *Planta*, **210**, 801-807.
- Kaiser, W. M., Weiner, H., Kandlbinder, A., Tsai, C.-B., Rockel, P., Sonoda, M., & Planchet, E.** 2002. Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 875-882.
- Kang, G. B., Kim, M.-K., Youn, H.-S., An, J. Y., Lee, J.-G., Park, K. R., Lee, S. H., Kim, Y., Fukuoka, S.-I., & Eom, S. H.** 2011. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human quinolinate phosphoribosyltransferase. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, **67**, 38-40.



- Kasimova, M. R., Grigiene, J., Krab, K., Hagedorn, P. H., Flyvbjerg, H., Andersen, P. E., & Møller, I. M. 2006. The free NADH concentration is kept constant in plant mitochondria under different metabolic conditions. *The Plant Cell*, **18**, 688-698.
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. 2002. The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae Interaction. *The Arabidopsis Book*, **20**, 1.
- Katoh, A., & Hashimoto, T. 2004. Molecular biology of pyridine nucleotide and nicotine biosynthesis. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, **9**, 1577-1586.
- Katoh, A., Uenohara, K., Akita, M., & Hashimoto, T. 2006. Early steps in the biosynthesis of NAD in Arabidopsis start with aspartate and occur in the plastid. *Plant Physiology*, **141**, 851-857.
- Kawai, S., Suzuki, S., Mori, S., & Murata, K. 2001. Molecular cloning and identification of UTR1 of a yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a gene encoding an NAD kinase. *FEMS Microbiology Letters*, **200**, 181-184.
- Kawai, S., & Murata, K. 2008. Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD (H) and NADP (H). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 803040811.
- Keys, A. J., Bird, I. F., Cornelius, M. J., Lea, P. J., Wallsgrave, R. M., & Miflin, B. J. 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature*. 275,741-743. *Nature*, **275**, 741-743.
- Keys, A. J. 2006. The re-assimilation of ammonia produced by photorespiration and the nitrogen economy of C3 higher plants. *Photosynthesis Research*, **87**, 165-175.
- Khan, J. A., Xiang, S., & Tong, L. 2007. Crystal Structure of Human Nicotinamide Riboside Kinase. *Structure*, **15**, 1005-1013.
- Kibinza, S., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J. M., Corbineau, F., & El-Maarouf-Bouteau, H. 2011. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, **181**, 309-315.
- Kinkema, M., Fan, W., & Dong, X. 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell*, **12**, 2339-2350.
- Koncz, C., & Schell, J. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *MGG Molecular & General Genetics*, **204**, 383-396.
- Koornneef, M., Bentsink, L., & Hilhorst, H. 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 33-36.
- Kornas, A., Kuźniak, E., Slesak, I., & Miszalski, Z. 2010. The key role of the redox status in regulation of metabolism in photosynthesizing organisms. *Acta Biochimica Polonica*, **57**, 143-151.
- Kornberg, A. 1948. The participation of inorganic pyrophosphate in the reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, **176**, 1475.
- Krinke, O., Flemer, M., Vergnolle, C., Collin, S., Renou, J.-P., Tacconat, L., Yu, A., Burketová, L., Valentová, O., Zachowski, A., & Ruelland, E. 2009. Phospholipase D activation is an early component of the salicylic acid signaling pathway in Arabidopsis cell suspensions. *Plant Physiology*, **150**, 424-436.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arents, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K. A. S., Becker, D., & Hedrich, R. 2010. Perception of the Arabidopsis Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor AtPEPR1 and Its Close Homologue AtPEPR2. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 13471-13479.

- Krömer, S., & Heldt, H. W. 1991. On the Role of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Photosynthesis Metabolism as Studied by the Effect of Oligomycin on Photosynthesis in Protoplasts and Leaves of Barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiology*, **95**, 1270-1276.
- Kruger, N. J., & von Schaewen, A. 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 236-246.
- Kurnasov, O. V., Polanuyev, B. M., Ananta, S., Sloutsky, R., Tam, A., Gerdes, S. Y. & Osterman, A. L. 2002. Ribosylnicotinamide kinase domain of NadR protein: Identification and implications in NAD biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, **184**, 6906-6917.
- Kurnasov, O., Goral, V., Colabroy, K., Gerdes, S., Anantha, S., Osterman, A., & Begley, T. P. 2003a. NAD Biosynthesis: Identification of the Tryptophan to Quinolinate Pathway in Bacteria. *Chemistry & biology*, **10**, 1195-1204.
- Kurnasov, O., Jablonski, L., Polanuyev, B., Dorrestein, P., Begley, T., & Osterman, A. 2003b. Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS microbiology letters*, **227**, 219-227.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., & Nambara, E. 2004. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO Journal*, **23**, 1647-1656.
- Kuzniak, E., & Skłodowska, M. 2005. Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta*, **222**, 192-200.
- Kwon, S. J., Jin, H. C., Lee, S., Nam, M. H., Chung, J. H., Kwon, S. I., Ryu, C.-M., & Park, O. K. 2009. GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **58**, 235-245.
- Lambeth, J. D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews. Immunology*, **4**, 181-189.
- Lamb, C., & Dixon, R. A. 1997. THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**, 251-275.
- Lam, H.-M., Wong, P., Chan, H.-K., Yam, K.-M., Chen, L., Chow, C.-M., & Coruzzi, G. M. 2003. Overexpression of the ASN1 gene enhances nitrogen status in seeds of Arabidopsis. *Plant Physiology*, **132**, 926-935.
- Lau, C., Dölle, C., Gossmann, T. I., Agledal, L., Niere, M., & Ziegler, M. 2010. Isoform-specific targeting and interaction domains in human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 18868-18876.
- Lea, P. J., & Mifflin, B. J. 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, **251**, 614-616.
- Lea, P. J., & Forde, B. G. 1994. The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant, Cell and Environment*, **17**, 541-556.
- Lea, U. S., Leydecker, M.-T., Quilleré, I., Meyer, C., & Lillo, C. 2006. Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. *Plant Physiology*, **140**, 1085-1094.
- Leckie, C. P., McAinsh, M. R., Allen, G. J., Sanders, D., & Hetherington, A. M. 1998. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 15837-15842.
- Lejay, L., Gansel, X., Cerezo, M., Tillard, P., Müller, C., Krapp, A., von Wirén, N., Daniel-Vedele, F., & Gojon, A. 2003. Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *The Plant Cell*, **15**, 2218-2232.

- Lemaire, G., & Millard, P.** 1998. An ecophysiological approach to modelling resource fluxes in competing plants. *Journal of Experimental Botany*, **50**, 15-28.
- De León, I. P., Sanz, A., Hamberg, M., & Castresana, C.** 2002. Involvement of the Arabidopsis alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **29**, 61-62.
- Lerner, F., Niere, M., Ludwig, A., & Ziegler, M.** 2001a. Structural and functional characterization of human NAD kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **288**, 69-74.
- Lerner, F., Niere, M., Ludwig, A., & Ziegler, M.** 2001b. Structural and functional characterization of human NAD kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **288**, 69-74.
- Liepman, A. H., Wightman, R., Geshi, N., Turner, S. R., & Scheller, H. V.** 2010. Arabidopsis - a powerful model system for plant cell wall research. *The Plant Journal*, **61**, 1107-1121.
- Lillo, C.** 1994. Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiologia Plantarum*, **62**, 89-94.
- Lillo, C., Meyer, C., & Ruoff, P.** 2001. The nitrate reductase circadian system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. *Plant Physiology*, **125**, 1554-1557.
- Lillo, C.** 2008. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *The Biochemical Journal*, **415**, 11-19.
- Lillo, C., Lea, U. S., Leydecker, M.-T., & Meyer, C.** 2003. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in constitutive activation of the enzyme in vivo and nitrite accumulation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **35**, 566-573.
- Lillo, C., Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F., & Oltedal, S.** 2004. Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 1275-1282.
- Lim, P. O., Woo, H. R., & Nam, H. G.** 2003. Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, **8**, 272-278.
- Lindroth, P., & Mopper, K.** 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry*, **51**, 1667-1674.
- Lin, L. F., & Henderson, L. M.** 1972. Pyridinium precursors of pyridine nucleotides in perfused rat kidney and in the testis. *The Journal of Biological Chemistry*, **247**, 8023-8030.
- Lin, S. J., Defossez, P. A., & Guarente, L.** 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)*, **289**, 2126-2128.
- Liu, G., Ji, Y., Bhuiyan, N. H., Pilot, G., Selvaraj, G., Zou, J., & Wei, Y.** 2010. Amino acid homeostasis modulates salicylic acid-associated redox status and defense responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **22**, 3845-3863.
- Liu, H., Woznica, K., Catton, G., Crawford, A., Botting, N., & Naismith, J. H.** 2007. Structural and kinetic characterization of quinolinate phosphoribosyltransferase (hQPRTase) from homo sapiens. *Journal of Molecular Biology*, **373**, 755-763.
- Liu, K. H., Huang, C. Y., & Tsay, Y. F.** 1999. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *The Plant Cell*, **11**, 865-874.
- Liu, L., Li, Y., Shi, Z., Du, G., & Chen, J.** 2006. Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: Increase of NAD<sup>+</sup> availability. *Journal of Biotechnology*, **126**, 173-185.
- Loake, G., & Grant, M.** 2007. Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 466-472.

- Loqué, D., Lalonde, S., Looger, L. L., von Wirén, N., & Frommer, W. B. 2007. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature*, **446**, 195-198.
- Loqué, D., Ludewig, U., Yuan, L., & von Wirén, N. 2005. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole. *Plant Physiology*, **137**, 671-680.
- Loqué, D., Yuan, L., Kojima, S., Gojon, A., Wirth, J., Gazzarrini, S., Ishiyama, K., Takahashi, H., & von Wirén, N. 2006. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **48**, 522-534.
- Lothier, J., Gaufichon, L., Sormani, R., Lemaître, T., Azzopardi, M., Morin, H., Chardon, F., Reisdorf-Cren, M., Avice, J.-C., & Masclaux-Daubresse, C. 2011. The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in Arabidopsis rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 1375-1390.
- Louw, A. E., & Dubery, I. A. 2000. Plant defense responses in isonicotinamide-treated tobacco cells. Evidence supporting a role for nicotinamide related metabolites as stress mediators in plant defense metabolism. *Journal of Plant Physiology*, **156**, 60-66.
- Ludewig, U., Neuhäuser, B., & Dynowski, M. 2007. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters*, **581**, 2301-2308.
- Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.-L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.-P., Szurek, B., Tacconnat, L., & Small, I. 2004. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *The Plant Cell*, **16**, 2089-2103.
- Mackey, D., Holt, B. F., 3rd, Wiig, A., & Dangl, J. L. 2002. RIN4 interacts with Pseudomonas syringae type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell*, **108**, 743-754.
- Mackintosh, C., & Meek, S. E. 2001. Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, **58**, 205-214.
- Magni, G., Amici, A., Emanuelli, M., Orsomando, G., Raffaelli, N., & Ruggieri, S. 2004. Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenyltransferase. *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 873-885.
- Magni, G., Amici, A., Emanuelli, M., Raffaelli, N., & Ruggieri, S. 1999. Enzymology of NAD<sup>+</sup> synthesis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **73**, 135-182, xi.
- Mahalingam, R., Jambunathan, N., & Penaganti, A. 2007. Pyridine Nucleotide Homeostasis in Plant Development and Stress. *International Journal of Plant Developmental Biology*, **1**, 194-201.
- Mainguet, S. E., Gakière, B., Majira, A., Pelletier, S., Bringel, F., Guérard, F., Caboche, M., Berthomé, R., & Renou, J. P. 2009. Uracil salvage is necessary for early Arabidopsis development. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **60**, 280-291.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., & Raskin, I. 1990. Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science (New York, N.Y.)*, **250**, 1002-1004.
- Mann, D. F., & Byerrum, R. U. 1974. Quinolinic acid phosphoribosyltransferase from castor bean endosperm. I. Purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, **249**, 6817-6823.
- Marini, A. M., Vissers, S., Urrestarazu, A., & André, B. 1994. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in Saccharomyces cerevisiae. *The EMBO Journal*, **13**, 3456-3463.
- Di Martino, C., & Pallotta, M. L. 2011. Mitochondria-localized NAD biosynthesis by nicotinamide mononucleotide adenyltransferase in Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) heterotrophic tissues. *Planta*,

- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., & Suzuki, A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, **105**, 1141-1157.
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M., Pageau, K., Lelandais, M., Grandjean, O., Kronenberger, J., Valadier, M.-H., Feraud, M., Jouglet, T., & Suzuki, A.** 2006. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology*, **140**, 444-456.
- Matsui, A., Yin, Y., Yamanaka, K., Iwasaki, M., & Ashihara, H.** 2007. Metabolic fate of nicotinamide in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **131**, 191-200.
- May, M. J., & Leaver, C. J.** 1993. Oxidative Stimulation of Glutathione Synthesis in *Arabidopsis thaliana* Suspension Cultures. *Plant Physiology*, **103**, 621-627.
- McClung, C. R., & Kay S. A.** 1994. In: Somerville, C. R., & Meyerowitz, E., eds, *Arabidopsis thaliana*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 615-637.
- Merdanovic, M., Sauer, E., & Reidl, J.** 2005. Coupling of NAD<sup>+</sup> biosynthesis and nicotinamide ribosyl transport: characterization of NadR ribonucleotide kinase mutants of *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology*, **187**, 4410-4420.
- Métraux, J.-P.** 2002. Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, **7**, 332-334.
- Metzler, D.** 2001. *Biochemistry: the chemical reaction of living cells*. 2<sup>e</sup> edn. San Diego California ; London: Harcourt/Academic.
- Meyer, C. & Stitt, M.** 2001. Nitrate reduction and signalling. In : Lea, P., Morot-Gaudry, J. F., eds. *Plant Nitrogen*. INRA Springer Verlag, 37-59.
- Meyer, A. J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., & Hell, R.** 2007. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **52**, 973-986.
- Michan, S., & Sinclair, D.** 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *The Biochemical Journal*, **404**, 1-13.
- Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., & Wells, D. M.** 2007. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 2297-2306.
- Miller, A. J., Fan, X., Shen, Q., & Smith, S. J.** 2008. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 111-119.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**, 405-410.
- Miyashita, Y., & Good, A. G.** 2008. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 667-680.
- Monéger, R., Vermeesch, J., Lechevallier, D., & Richard, C.** 1977. Micro-analyse du NADP et du NAD réduits et oxydés dans les tissus foliaires et dans les plastes isolés de *Spirodèle* et de *Blé*, *Physiologie Végégétale*, **15**, 29-62.

- Morot-Gaudry, J. F.** 1997. Sources et cycle de l'azote. In : *Assimilation de l'azote chez les plantes : aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. Morot-Gaudry (ed). Paris: Institut national de la recherche agronomique, 22-25.
- Moudgil, K. D., & Sadasivudu, B.** 2004. Metabolism of proteins and non-protein nitrogenous compounds. In: *Biochemistry and Human Biology*, PHI Learning, New Dehli edn. pp. 409-441. Talwar G.P., Srivastava L.M.
- Mou, Z., Fan, W., & Dong, X.** 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, **113**, 935-944.
- Mullineaux, P. M., & Rausch, T.** 2005. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research*, **86**, 459-474.
- Mur, L. A. J., Laarhoven, L. J. J., Harren, F. J. M., Hall, M. A., & Smith, A. R.** 2008. Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response. *Plant Physiology*, **148**, 1537-1546.
- Nasu, S., Wicks, F. D., & Gholson, R. K.** 1982. L-Aspartate oxidase, a newly discovered enzyme of *Escherichia coli*, is the B protein of quinolinate synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, **257**, 626-632.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. & Jones, J.D.G.** 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology*, **135**, 1113-1128.
- Neuburger, M., & Douce, R.** 1983. Slow passive diffusion of NAD<sup>+</sup> between intact isolated plant mitochondria and suspending medium. *The Biochemical Journal*, **216**, 443-450.
- Nicholls, D., & Ferguson, S. J.** 2002. *Bioenergetics 3*. [1st ed.]. edn. San Diego Calif.: Academic Press.
- Nicotera, P., & Melino, G.** 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, **23**, 2757-2765.
- Niedel, J., & Dietrich, L. S.** 1973. Nicotinate phosphoribosyltransferase of human erythrocytes. Purification and properties. *The Journal of Biological Chemistry*, **248**, 3500-3505.
- Noctor, G., Queval, G., & Gakière, B.** 2006. NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 1603-1620.
- Noctor, G.** 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell & Environment*, **29**, 409-425.
- North, B. J., & Verdin, E.** 2004. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biology*, **5**, 224.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L.** 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, **198**, 249-266.
- Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., & Stitt, M.** 2010. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant*, **3**, 973-996.
- Nunes-Nesi, A., Sulpice, R., Gibon, Y., & Fernie, A. R.** 2008. The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 1675-1684.
- Nussaume, L., Vincentz, M., Meyer, C., Boutin, J. P., & Caboche, M.** 1995. Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by an N-terminal deletion. *The Plant Cell*, **7**, 611-621.
- Ogawa, T., Ueda, Y., Yoshimura, K., & Shigeoka, S.** 2005. Comprehensive analysis of cytosolic Nudix hydrolases in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 25277-25283.



- Ohlsson, A. B., Landberg, T., Berglund, T., & Greger, M.** 2008. Increased metal tolerance in *Salix* by nicotinamide and nicotinic acid. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française De Physiologie Végétale*, **46**, 655-664.
- Oh, J., Hong, S., Lee, Y., Koh, E., Kim, K., Seo, Y., Chung, N., Jeong, M., Jang, C., & Lee, B.** 2005. Modulation of gene expressions and enzyme activities of methionine sulfoxide reductases by cold, ABA or high salt treatments in. *Plant Science*, **169**, 1030-1036.
- Oliver, D. J., & Raman, R.** 1995. Glycine decarboxylase: protein chemistry and molecular biology of the major protein in leaf mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **27**, 407-414.
- Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., & Baganz, F.** 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, **16**, 373-378.
- Ollagnier-de Choudens, S., Loiseau, L., Sanakis, Y., Barras, F., & Fontecave, M.** 2005. Quinolinate synthetase, an iron-sulfur enzyme in NAD biosynthesis. *FEBS Letters*, **579**, 3737-3743.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F., & Bailly, C.** 2009. The Mechanisms Involved in Seed Dormancy Alleviation by Hydrogen Cyanide Unravel the Role of Reactive Oxygen Species as Key Factors of Cellular Signaling during Germination. *Plant Physiology*, **150**, 494-505.
- Orsel, M., Krapp, A., & Daniel-Vedele, F.** 2002. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis. Structure and gene expression. *Plant Physiology*, **129**, 886-896.
- Osterman, A. L., & Begley, T. P.** 2007. A subsystems-based approach to the identification of drug targets in bacterial pathogens. *Progress in Drug Research. Fortschritte Der Arzneimittelforschung. Progrès Des Recherches Pharmaceutiques*, **64**, 131, 133-170.
- Outten, C. E., & Culotta, V. C.** 2003. A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, **22**, 2015-2024.
- Ozment, C., Barchue, J., DeLucas, L. J., & Chattopadhyay, D.** 1999. Structural study of *Escherichia coli* NAD synthetase: overexpression, purification, crystallization, and preliminary crystallographic analysis. *Journal of Structural Biology*, **127**, 279-282.
- Palmieri, F., Rieder, B., Ventrella, A., Blanco, E., Do, P. T., Nunes-Nesi, A., Trauth, A. U., Fiermonte, G., Tjaden, J., Agrimi, G., Kirchberger, S., Paradies, E., Fernie, A. R., & Neuhaus, H. E.** 2009. Molecular Identification and Functional Characterization of Arabidopsis thaliana Mitochondrial and Chloroplastic NAD<sup>+</sup> Carrier Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 31249-31259.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T. G. A., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R. I., Gamage, H. K., Carroll, B. J., Schenk, P. M., & Schmidt, S.** 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 4524-4529.
- Pellny, T. K., Van Aken, O., Dutilleul, C., Wolff, T., Groten, K., Bor, M., De Paepe, R., Reyss, A., Van Breusegem, F., Noctor, G., & Foyer, C. H.** 2008. Mitochondrial respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogen-dependent regulation of plant architecture in *Nicotiana glauca*. *The Plant Journal*, **54**, 976-992.
- Penninckx, I. A., Thomma, B. P., Buchala, A., Métraux, J. P., & Broekaert, W. F.** 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **10**, 2103-2113.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. M.** 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, **5**, 308-316.
- Pieterse, & van Loon LC.** 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, **4**, 52-58.

- Pieterse, C. M. J. 1998. A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **10**, 1571-1580.
- Pike, S. M., **Ádám, A. L., Pu, X.-A., Hoyos, M. E., Laby, R., Beer, S. V., & Novacky, A.** 1998. Effects of *Erwinia amylovora* harpin on tobacco leaf cell membranes are related to leaf necrosis and electrolyte leakage and distinct from perturbations caused by inoculated *E. amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **53**, 39-60.
- Pilgrim, M. L., Caspar, T., Quail, P. H., & McClung, C. R. 1993. Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, **23**, 349-364.
- Pollak, N., Dölle, C., & Ziegler, M. 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochemical Journal*, **402**, 205.
- Pracharoenwattana, I., Zhou, W., Keech, O., Francisco, P. B., Udomchalothorn, T., Tschoep, H., Stitt, M., Gibon, Y., & Smith, S. M. 2010. Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **62**, 785-795.
- Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A., & Stewart, C. R. 1994. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. *The Plant Cell*, **6**, 65-74.
- Preiss, J., & Handler, P. 1958a. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, **233**, 488-492.
- Preiss, J., & Handler, P. 1958b. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. *The Journal of Biological Chemistry*, **233**, 493-500.
- Queval, G., & Noctor, G. 2007. A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Analytical biochemistry*, **363**, 58–69.
- Rachmilevitch, S., Cousins, A. B., & Bloom, A. J. 2004. Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 11506-11510.
- Raffaelli, N., Lorenzi, T., Mariani, P. L., Emanuelli, M., Amici, A., Ruggieri, S., & Magni, G. 1999. The *Escherichia coli* NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity. *Journal of Bacteriology*, **181**, 5509-5511.
- Raffaelli, N., Sorci, L., Amici, A., Emanuelli, M., Mazzola, F., & Magni, G. 2002. Identification of a novel human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **297**, 835-840.
- Ravanel, S., Gakière, B., Job, D., & Douce, R. 1998. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 7805-7812.
- Rawat, S. R., Silim, S. N., Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., & Glass, A. D. 1999. AtAMT1 gene expression and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake in roots of Arabidopsis thaliana: evidence for regulation by root glutamine levels. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **19**, 143-152.
- Rébeillé, F., Jabrin, S., Bligny, R., Loizeau, K., Gambonnet, B., Van Wilder, V., Douce, R., & Ravanel, S. 2006. Methionine catabolism in Arabidopsis cells is initiated by a gamma-cleavage process and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 15687-15692.
- Redinbaugh, M. G., & Campbell, W. H. 1985. Quaternary structure and composition of squash NADH:nitrate reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, **260**, 3380-3385.



- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., Tillard, P., Forde, B. G., & Gojon, A. 2006. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 19206-19211.
- Revollo, J. R., Grimm, A. A., & Imai, S-ichiro. 2004. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 50754-50763.
- Roberts, D. M., & Harmon, A. C. 1992. Calcium-Modulated Proteins: Targets of Intracellular Calcium Signals in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**, 375-414.
- Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S. K., Wang, A., Suka, N., & Grunstein, M. 2002. Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell*, **109**, 437-446.
- Rochat, C., & Boutin, J.-P. 1991. Metabolism of Phloem-borne Amino Acids in Maternal Tissues of *Pisum sativum* L.. *Journal of Experimental Botany*, **42**, 207-214.
- Rongvaux, A., Andris, F., Van Gool, F., & Leo, O. 2003. Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, **25**, 683-690.
- Rongvaux, A., Shea, R. J., Mulks, M. H., Gigot, D., Urbain, J., Leo, O., & Andris, F. 2002. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *European Journal of Immunology*, **32**, 3225-3234.
- Rouhier, N., Vieira Dos Santos, C., Tarrago, L., & Rey, P. 2006. Plant methionine sulfoxide reductase A and B multigenic families. *Photosynthesis Research*, **89**, 247-262.
- Rousset, C. 2009. Etude Structurale et Fonctionnelle de la Quinolinate Synthase: une protéine fer-soufre cible d'agents antibactériens. Grenoble, France: Université Joseph Fourier.
- Rousset, C., Fontecave, M., & Ollagnier de Choudens, S. 2008. The [4Fe-4S] cluster of quinolinate synthase from *Escherichia coli*: investigation of cluster ligands. *FEBS Letters*, **582**, 2937-2944.
- Rozenberg, A., & Lee, J. K. 2008. Theoretical studies of the quinolinic acid to nicotinic acid mononucleotide transformation. *The Journal of Organic Chemistry*, **73**, 9314-9319.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., & Hunt, M. D. 1996. Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, **8**, 1809-1819.
- Ryrie, I. J., & Scott, K. J. 1968. Metabolic Regulation in Diseased Leaves II. Changes in Nicotinamide Nucleotide Coenzymes in Barley Leaves Infected With Powdery Mildew. *Plant Physiology*, **43**, 687-692.
- Sakakibara, H., Takei, K., & Hirose, N. 2006. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Science*, **11**, 440-448.
- Sakuraba, H., Tsuge, H., Yoneda, K., Katunuma, N., & Ohshima, T. 2005. Crystal structure of the NAD biosynthetic enzyme quinolinate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 26645-26648.
- Sanchez, J., & Heldt, H. W. 1990. On the regulation of spinach nitrate reductase. *Plant Physiology*, **92**, 684-689.
- Sánchez, J.-P., Duque, P., & Chua, N.-H. 2004. ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **38**, 381-395.
- Saunders, J. W., & Bush, L. P. 1979. Nicotine Biosynthetic Enzyme Activities in *Nicotiana tabacum* L. Genotypes with Different Alkaloid Levels. *Plant Physiology*, **64**, 236-240.

- Sauve, A. A. 2008. NAD<sup>+</sup> and vitamin B3: from metabolism to therapies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **324**, 883-893.
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, **30**, 1191-1212.
- Schär, P., Herrmann, G., Daly, G., & Lindahl, T. 1997. A newly identified DNA ligase of *Saccharomyces cerevisiae* involved in RAD52-independent repair of DNA double-strand breaks. *Genes & Development*, **11**, 1912-1924.
- Scheible, W. R., Gonzalez-Fontes, A., Lauerer, M., Muller-Rober, B., Caboche, M., & Stitt, M. 1997a. Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. *The Plant Cell*, **9**, 783-798.
- Scheible, W.-R., Lauerer, M., Schulze, E.-D., Caboche, M., & Stitt, M. 1997b. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *The Plant Journal*, **11**, 671-691.
- Scheible, W.-R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K., & Stitt, M. 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*, **136**, 2483-2499.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (New York, N.Y.)*, **270**, 467-470.
- Schippers, J. H. M., Nunes-Nesi, A., Apetrei, R., Hille, J., Fernie, A. R., & Dijkwel, P. P. 2008. The *Arabidopsis* onset of leaf death5 Mutation of Quinolinate Synthase Affects Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis and Causes Early Ageing. *The Plant Cell Online*, **20**, 2909-2925.
- Schneider, M., Schweizer, P., Meuwly, P., & Metraux, J. 1996. Systemic Acquired Resistance in Plants. Dans: *International Review of Cytology*, **168**, 303-340. Elsevier.
- Schrödinger, E. 1986. *Qu'est-ce que la vie ? : de la physique à la biologie*. Paris: Points Sciences.
- Schweiger, M., Hennig, K., Lerner, F., Niere, M., Hirsch-Kauffmann, M., Specht, T., Weise, C., Oei, S. L., & Ziegler, M. 2001. Characterization of recombinant human nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase (NMNAT), a nuclear enzyme essential for NAD synthesis. *FEBS Letters*, **492**, 95-100.
- Sclep, G., Allemeersch, J., Liechti, R., De Meyer, B., Beynon, J., Bhalerao, R., Moreau, Y., Nietfeld, W., Renou, J.-P., Reymond, P., Kuiper, M. T., & Hilson, P. 2007. CATMA, a comprehensive genome-scale resource for silencing and transcript profiling of *Arabidopsis* genes. *BMC Bioinformatics*, **8**, 400.
- Segal, A. W. 2008. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **40**, 604-618.
- Sestini, S., Jacomelli, G., Pescaglioni, M., Micheli, V., & Pompucci, G. 2000. Enzyme activities leading to NAD synthesis in human lymphocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **379**, 277-282.
- Shah, J., Kachroo, P., & Klessig, D. F. 1999. The *Arabidopsis* ssi1 mutation restores pathogenesis-related gene expression in npr1 plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *The Plant Cell*, **11**, 191-206.
- Shah, J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 365-371.
- Sharma, V., Grubmeyer, C., & Sacchettini, J. C. 1998. Crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential TB drug target. *Structure (London, England: 1993)*, **6**, 1587-1599.

- Shibata, K., Hayakawa, T., & Iwai, K.** 1986. Tissue distribution of the enzymes concerned with the biosynthesis of NAD in rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, **50**, 3037-3041.
- Shibata, K., Hayakawa, T., Taguchi, H., & Iwai, K.** 1991. Regulation of pyridine nucleotide coenzyme metabolism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **294**, 207-218.
- Shirano, Y., Kachroo, P., Shah, J., & Klessig, D. F.** 2002. A gain-of-function mutation in an Arabidopsis Toll Interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *The Plant Cell*, **14**, 3149-3162.
- Simon, C., Langlois-Meurinne, M., Bellvert, F., Garmier, M., Didierlaurent, L., Massoud, K., Chaouch, S., Marie, A., Bodo, B., Kauffmann, S., Noctor, G., & Saindrenan, P.** 2010a. The differential spatial distribution of secondary metabolites in Arabidopsis leaves reacting hypersensitively to *Pseudomonas syringae* pv. tomato is dependent on the oxidative burst. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 3355-3370.
- Simon, C., Langlois-Meurinne, M., Bellvert, F., Garmier, M., Didierlaurent, L., Massoud, K., Chaouch, S., Marie, A., Bodo, B., Kauffmann, S., Noctor, G., & Saindrenan, P.** 2010b. The differential spatial distribution of secondary metabolites in Arabidopsis leaves reacting hypersensitively to *Pseudomonas syringae* pv. tomato is dependent on the oxidative burst. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 3355-3370.
- Simon, P., Dieter, P., Bonzon, M., Greppin, H., & Marm, D.** 1982. Calmodulin-dependent and independent NAD kinase activities from cytoplasmic and chloroplastic fractions of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Cell Reports*, **1**, 119-122.
- Sinclair, S. J., Murphy, K. J., Birch, C. D., & Hamill, J. D.** 2000. Molecular characterization of quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRtase) in *Nicotiana*. *Plant Molecular Biology*, **44**, 603-617.
- Slocum, R.** 2005. Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**, 729-745.
- Sonoli, S. S., Shivprasad, S., Prasad, C. V. B., Patil, A. B., Desai, P. B., & Somannavar, M. S.** 2011. Visfatin--a review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **15**, 9-14.
- Spencer, R. L., & Preiss, J.** 1967. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. The purification and the properties of diphosphopyridine nucleotide synthetase from *Escherichia coli* b. *The Journal of Biological Chemistry*, **242**, 385-392.
- Srivastava, H. S., & Shankar, N.** 1996. Molecular biology and biotechnology of higher plant nitrate reductases. *Current Science* 71(9): 702-709. *Current Science*, **71**, 702-709.
- Stephan, C., Renard, M., & Montrichard, F.** 2000. Evidence for the existence of two soluble NAD(+) kinase isoenzymes in *Euglena gracilis* Z. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **32**, 855-863.
- Stitt, M., & Krapp, A.** 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment*, **22**, 583-621.
- Suda, Y., Tachikawa, H., Yokota, A., Nakanishi, H., Yamashita, N., Miura, Y., & Takahashi, N.** 2003. *Saccharomyces cerevisiae* QNS1 codes for NAD(+) synthetase that is functionally conserved in mammals. *Yeast (Chichester, England)*, **20**, 995-1005.
- Sugiyama, M., Yeung, E. C., Shoji, Y., & Komamine, A.** 1995. Possible involvement of DNA-repair events in the transdifferentiation of mesophyll cells of *Zinnia elegans* into tracheary elements. *Journal of Plant Research*, **108**, 351-361.
- Suzuki, A., & Knaff, D. B.** 2005. Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. *Photosynthesis Research*, **83**, 191-217.

- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., & Dong, X. 2008. Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science*, **321**, 952-956.
- Taira, M., Valtersson, U., Burkhardt, B., & Ludwig, R. A. 2004. Arabidopsis thaliana GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *The Plant Cell*, **16**, 2048-2058.
- Takahara, K., Kasajima, I., Takahashi, H., Hashida, S.-nosuke, Itami, T., Onodera, H., Toki, S., Yanagisawa, S., Kawai-Yamada, M., & Uchimiya, H. 2010. Metabolome and photochemical analysis of rice plants overexpressing Arabidopsis NAD kinase gene. *Plant Physiology*, **152**, 1863-1873.
- Takahashi, H., Takahara, K., Hashida, S.-n, Hirabayashi, T., Fujimori, T., Kawai-Yamada, M., Yamaya, T., Yanagisawa, S., & Uchimiya, H. 2009. Pleiotropic Modulation of Carbon and Nitrogen Metabolism in Arabidopsis Plants Overexpressing the NAD kinase2 Gene. *Plant Physiology*, **151**, 100-113.
- Tao, W., Grubmeyer, C., & Blanchard, J. S. 1996. Transition state structure of Salmonella typhimurium orotate phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, **35**, 14-21.
- Tcherkez, G., Nogués, S., Bleton, J., Cornic, G., Badeck, F., & Ghashghaie, J. 2003. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO<sub>2</sub> in French bean. *Plant Physiology*, **131**, 237-244.
- Tcherkez, G., Schäufele, R., Nogués, S., Piel, C., Boom, A., Lanigan, G., Barbaroux, C., Mata, C., Elhani, S., Hemming, D., Maguas, C., Yakir, D., Badeck, F. W., Griffiths, H., Schnyder, H., & Ghashghaie, J. 2010. On the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotopic signal of day and night respiration at the mesocosm level. *Plant, Cell & Environment*, **33**, 900-913.
- Thielert, W. 2006. A unique product: The story of the imidacloprid stress shield. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, **59**, 73-86.
- Thielert, W., Metzloff, M., De Block, M. 2009. Increase of stress tolerance by application of neonicotinoids on plants engineered to be stress tolerant. *US Patent Application* 0270254 A1.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y., & Stitt, M. 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **37**, 914-939.
- Thordal-Christensen, H. 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 351-357.
- Todisco, S., Agrimi, G., Castegna, A., & Palmieri, F. 2006. Identification of the mitochondrial NAD<sup>+</sup> transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 1524-1531.
- Torres, M. A. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, **138**, 414-429.
- Torres, M. A., & Dangl, J. L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 397-403.
- Torres, M. A., Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. 2002. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 517-522.
- Trapp, J., & Jung, M. 2006. The role of NAD<sup>+</sup> dependent histone deacetylases (sirtuins) in ageing. *Current Drug Targets*, **7**, 1553-1560.
- Turner, W. L., Waller, J. C., & Snedden, W. A. 2005. Identification, molecular cloning and functional characterization of a novel NADH kinase from Arabidopsis thaliana (thale cress). *The Biochemical Journal*, **385**, 217-223.
- Turner, W. L., Waller, J. C., Vanderbeld, B., & Snedden, W. A. 2004. Cloning and characterization of two NAD kinases from Arabidopsis. identification of a calmodulin binding isoform. *Plant Physiology*, **135**, 1243-1255.

- Vanderauwera, S., De Block, M., Van de Steene, N., van de Cotte, B., Metzlauff, M., & Van Breusegem, F.** 2007. Silencing of poly(ADP-ribose) polymerase in plants alters abiotic stress signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 15150-15155.
- Vanoni, M. A., & Curti, B.** 2008. Structure-function studies of glutamate synthases: a class of self-regulated iron-sulfur flavoenzymes essential for nitrogen assimilation. *IUBMB Life*, **60**, 287-300.
- Veljovic-Jovanovic, S. D., Pignocchi, C., Noctor, G., & Foyer, C. H.** 2001. Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology*, **127**, 426-435.
- Vidmar, J. J., Zhuo, D., Siddiqi, M. Y., Schjoerring, J. K., Touraine, B., & Glass, A. D.** 2000. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology*, **123**, 307-318.
- Vincenz, M., & Caboche, M.** 1991. Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *The EMBO Journal*, **10**, 1027-1035.
- Vincenz, M., Moureaux, T., Leydecker, M. T., Vaucheret, H., & Caboche, M.** 1993. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **3**, 315-324.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F.** 2009. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, **47**, 177-206.
- Wagner, R., & Wagner, K. G.** 1985. The pyridine-nucleotide cycle in tobacco Enzyme activities for the de-novo synthesis of NAD. *Planta*, **165**, 532-537.
- Wagner, R., Feth, F., & Wagner, K. G.** 1986a. Regulation in tobacco callus of enzyme activities of the nicotine pathway. *Planta*, **168**, 408-413.
- Wagner, R., Feth, F., & Wagner, K. G.** 1986b. The pyridine-nucleotide cycle in tobacco : Enzyme activities for the recycling of NAD. *Planta*, **167**, 226-232.
- Wagner, R., & Wagner, K. G.** 1984. Determination of quinolinic acid phosphoribosyl-transferase in tobacco. *Phytochemistry*, **23**, 1881-1883.
- Waller, G. R., Yang, K. S., Gholson, R. K., Hadwiger, L. A., & Chaykin, S.** 1966. The pyridine nucleotide cycle and its role in the biosynthesis of ricinine by *Ricinus communis* L. *The Journal of Biological Chemistry*, **241**, 4411-4418.
- Wang, C., Gao, F., Wu, J., Dai, J., Wei, C., & Li, Y.** 2010. *Arabidopsis* Putative Deacetylase AtSRT2 Regulates Basal Defense by Suppressing PAD4, EDS5 and SID2 Expression. *Plant and Cell Physiology*, **51**, 1291-1299.
- Wang, G., & Pichersky, E.** 2007. Nicotinamidase participates in the salvage pathway of NAD biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **49**, 1020-1029.
- Wang, K., Conn, K., & Lazarovits, G.** 2006. Involvement of quinolinate phosphoribosyl transferase in promotion of potato growth by a *Burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 760-768.
- Wang, R., & Crawford, N. M.** 1996. Genetic identification of a gene involved in constitutive, high-affinity nitrate transport in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 9297-9301.
- Wang, R., Guegler, K., LaBrie, S. T., & Crawford, N. M.** 2000. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *The Plant Cell*, **12**, 1491-1509.



- Wang, R., Liu, D., & Crawford, N. M.** 1998. The Arabidopsis CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 15134-15139.
- Wang, R., Okamoto, M., Xing, X., & Crawford, N. M.** 2003. Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology*, **132**, 556.
- Wang, X., Lopez-Valenzuela, J. A., Gibbon, B. C., Gakiere, B., Galili, G., & Larkins, B. A.** 2007. Characterization of monofunctional aspartate kinase genes in maize and their relationship with free amino acid content in the endosperm. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 2653-2660.
- Warburg, O., & Christian, W.** 1936. Pyridin, the hydrogen-transferring component of the fermentation enzymes (pyridine nucleotide). *Biochemische Zeitschrift*, **287**, 291.
- Wäspi, U., Schweizer, P., & Dudler, R.** 2001. Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew. *The Plant Cell*, **13**, 153-161.
- Wasternack, C., & Kombrink, E.** 2010. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology*, **5**, 63-77.
- Weigel, D., & Glazebrook, J.** 2002. Arabidopsis: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Weigel, R. R.** 2005. Interaction of NIMIN1 with NPR1 Modulates PR Gene Expression in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **17**, 1279-1291.
- Westphal, C. H., Dipp, M. A., & Guarente, L.** 2007. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? *Trends in Biochemical Sciences*, **32**, 555-560.
- Wigge, B., Kromer, S., & Gardstrom, P.** 1993. The redox levels and subcellular distribution of pyridine nucleotides in illuminated barley leaf protoplasts studied by rapid fractionation. *Physiologia Plantarum*, **88**, 10-18.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M.** 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**, 562-565.
- Wilkinson, J. Q., & Crawford, N. M.** 1991. Identification of the Arabidopsis CHL3 gene as the nitrate reductase structural gene NIA2. *The Plant Cell*, **3**, 461-471.
- Williams, G. T., Lau, K. M., Coote, J. M., & Johnstone, A. P.** 1985. NAD metabolism and mitogen stimulation of human lymphocytes. *Experimental Cell Research*, **160**, 419-426.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J.** 2007. An « Electronic Fluorescent Pictograph » browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*, **2**, e718.
- Wogulis, M., Chew, E. R., Donohoue, P. D., & Wilson, D. K.** 2008. Identification of formyl kynurenine formamidase and kynurenine aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae* using crystallographic, bioinformatic and biochemical evidence. *Biochemistry*, **47**, 1608-1621.
- Wojcik, M., Seidle, H. F., Bieganowski, P., & Brenner, C.** 2006. Glutamine-dependent NAD<sup>+</sup> synthetase. How a two-domain, three-substrate enzyme avoids waste. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 33395-33402.
- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kägi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S. A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S. W., & Mak, T. W.** 1998. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes & Development*, **12**, 806-819.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., & Zhu, J.-K.** 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, **14 Suppl**, S165-183.

- Xu, Y.** 1994. Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *The Plant Cell Online*, **6**, 1077-1085.
- Yahraus, T., Chandra, S., Legendre, L., & Low, P. S.** 1995. Evidence for a Mechanically Induced Oxidative Burst. *Plant Physiology*, **109**, 1259-1266.
- Yamada, K., Hara, N., Shibata, T., Osago, H., & Tsuchiya, M.** 2006. The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **352**, 282-285.
- Yamamoto, Y.** 1963. Pyridine Nucleotide Content in the Higher Plant. Effect of Age of Tissue. *Plant Physiology*, **38**, 45-54.
- Yoshimoto, K.** 2010. Plant autophagy puts the brakes on cell death by controlling salicylic acid signaling. *Autophagy*, **6**, 192-193.
- Yu, Sukumaran, & Mrton.** 1998. Differential expression of the arabidopsis nia1 and nia2 genes. cytokinin-induced nitrate reductase activity is correlated with increased nia1 transcription and mrna levels. *Plant Physiology*, **116**, 1091-1096.
- Yuan, L., Loqué, D., Kojima, S., Rauch, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Takahashi, H., & von Wirén, N.** 2007a. The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *The Plant Cell*, **19**, 2636-2652.
- Yuan, L., Loqué, D., Ye, F., Frommer, W. B., & von Wirén, N.** 2007b. Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1. *Plant Physiology*, **143**, 732-744.
- Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P., & Forde, B. G.** 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 6529-6534.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X., & Zhou, J.-M.** 2007. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe*, **1**, 175-185.
- Zhang, Q., Piston, D. W., & Goodman, R. H.** 2002. Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science (New York, N.Y.)*, **295**, 1895-1897.
- Zhang, X.** 2003. Structural Characterization of a Human Cytosolic NMN/NaMN Adenylyltransferase and Implication in Human NAD Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 13503-13511.
- Zhang, X., & Mou, Z.** 2009. Extracellular pyridine nucleotides induce *PR* gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **57**, 302-312.
- Zhang, X., Kurnasov, O. V., Karthikeyan, S., Grishin, N. V., Osterman, A. L., & Zhang, H.** 2003. Structural characterization of a human cytosolic NMN/NaMN adenylyltransferase and implication in human NAD biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 13503-13511.
- Zhao, Y., Dai, X., Blackwell, H. E., Schreiber, S. L., & Chory, J.** 2003. SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics. *Science (New York, N.Y.)*, **301**, 1107-1110.
- Zheng, X.-Q., Hayashibe, E., & Ashihara, H.** 2005. Changes in trigonelline (N-methylnicotinic acid) content and nicotinic acid metabolism during germination of mungbean (*Phaseolus aureus*) seeds. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 1615-1623.
- Zheng, X.-Q., Nagai, C., & Ashihara, H.** 2004. Pyridine nucleotide cycle and trigonelline (N-methylnicotinic acid) synthesis in developing leaves and fruits of *Coffea arabica*. *Physiologia Plantarum*, **122**, 404-411.

## Références bibliographiques

- Zhou, Y. J., Wang, L., Yang, F., Lin, X., Zhang, S., & Zhao, Z. K.** 2011. Questing the extremes of the cellular NAD(H) level using an *Escherichia coli* NAD<sup>+</sup> auxotrophic mutant. *Applied and Environmental Microbiology*,
- Zhuo, D., Okamoto, M., Vidmar, J. J., & Glass, A. D.** 1999. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **17**, 563-568.
- Zhu, X.-G., Long, S. P., & Ort, D. R.** 2008a. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Current Opinion in Biotechnology*, **19**, 153-159.
- Zhu, Y., Eiteman, M. A., Altman, R., & Altman, E.** 2008b. High Glycolytic Flux Improves Pyruvate Production by a Metabolically Engineered *Escherichia coli* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 6649-6655.
- Zimmermann, P., & Zentgraf, U.** 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **10**, 515-534.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., & Gruissem, W.** 2004. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*, **136**, 2621-2632.
- Zipfel, C.** 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, **20**, 10-16.
- Zipfel, C., & Felix, G.** 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 353-360.





# Annexes



## Annexe1

**Listes des gènes modulés de façon statistiquement significative en réponse à l'augmentation des teneurs intracellulaires en NAD.** L'annotation de la fonction des gènes a été réalisée à partir des informations disponibles sur le site TAIR (voir Matériels et Méthodes). Les gènes sont listés dans l'ordre croissant des modulations transcriptionnelles observées pour la condition B (*Ctrl+Q vs nadC+Q*).

Genes	A		B		C		D		Fonction
	nadC+	Q vs nadC	nad + Q vs Ctrl + Q	nad + Q vs Ctrl	Ctrl + Q vs Ctrl	Ctrl + Q vs Ctrl	nadC vs Ctrl	nadC vs Ctrl	
AT5G15970	-1.54	-2.65	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	COLD-RESPONSIVE 6.6
AT5G47060	-0.05	-1.73	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	Unknown
AT1G29910	-1.12	-1.52	-0.37	-0.37	-0.37	-0.37	-0.37	-0.37	CAB3 CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 3
AT5G26000	-1.3	-1.5	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	BETA GLUCOSIDASE 38
AT2G34430	-0.87	-1.39	-0.03	-0.03	-0.03	-0.03	-0.03	-0.03	LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEX II SUBUNIT B1
AT1G52580	-0.95	-1.33	-0.06	-0.06	-0.06	-0.06	-0.06	-0.06	RHOBOID-like protein 5 (RBL5). Functions in serine-type endopeptidase activity
AT3G47470	-0.95	-1.33	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14	LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEX SUBUNIT A4
AT1G52000	-1.85	-1.32	-0.35	-0.35	-0.35	-0.35	-0.35	-0.35	Mannose-binding lectin superfamily protein
AT1G29930	-0.89	-1.31	-0.24	-0.24	-0.24	-0.24	-0.24	-0.24	CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1
AT2G38540	-0.99	-1.28	-0.33	-0.33	-0.33	-0.33	-0.33	-0.33	LIPID TRANSFER PROTEIN 1 AT1TP1
AT2G20670	-0.82	-1.28	-0.82	-0.82	-0.82	-0.82	-0.82	-0.82	Unknown
AT1G09310	-1.33	-1.27	-0.36	-0.36	-0.36	-0.36	-0.36	-0.36	Unknown
AT2G28630	-1.3	-1.26	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	3-KETOACYL-COA SYNTHASE 12 (KCS12), involved in the biosynthesis of VLCFA (very long chain fatty acid)
AT2G15970	-0.92	-1.18	-0.29	-0.29	-0.29	-0.29	-0.29	-0.29	COLD-REGULATED413 PLASMA MEMBRANE 1
AT2G38530	-0.79	-1.18	-0.26	-0.26	-0.26	-0.26	-0.26	-0.26	CELL GROWTH DEFECT FACTOR-3 LIPID TRANSFER PROTEIN 2. Involved in lipid transfer between membranes, Belongs to a family of lipid transfer proteins
AT2G24270	-1.14	-1.15	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	ALDEHYDE DEHYDROGENASE 11A3 : protein with non-phosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity
AT5G13710	-0.77	-1.14	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	STEROL METHYLTRANSFERASE 1 SMT1 controls the level of cholesterol in plants
AT5G64740	-0.88	-1.13	-0.16	-0.16	-0.16	-0.16	-0.16	-0.16	cellulose synthase isomer, CES6G mutants have cellulose defect in the primary cell wall
AT1G30290	-1.49	-1.11	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	Unknown
AT2G45180	-1.23	-1.1	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein;
AT4G12470	-0.31	-1.09	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	AZ11 (AZELAIC ACID INDUCED 1), involved in the priming of salicylic acid induction and systemic immunity triggered by pathogen or azelaic acid.
AT1G03300	-0.63	-1.09	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	ZINC TRANSPORTER 5 PRECURSOR ZIPS
AT5G21160	-1.18	-1.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	LA RNA-binding protein
AT4G32410	-1.26	-1.08	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	cellulose synthase isomer, CES41 mutants have cellulose defect in the primary cell wall,
AT1G65960	-0.99	-1.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	GAD2 GLUTAMATE DECARBOXYLASE 2
AT3G52840	-0.83	-1.06	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	beta-galactosidase 2 (BGAL2)
AT4G05310	-0.95	-1.06	-0.49	-0.49	-0.49	-0.49	-0.49	-0.49	Ubiquitin-like superfamily protein
AT5G25980	-0.77	-1.05	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	Myrosinase (thioglucoside glucosylase) gene involved in glucosinolate metabolism, BETA GLUCOSIDASE 37
AT2G45960	-0.75	-1.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1;2 a member of the plasma membrane intrinsic protein subfamily PIP1
AT3G24650	-0.84	-1.03	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT 1
AT2E00901	-1.38	-1.03	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	Unknown
AT2G43620	-0.67	-1.03	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	Chitinase family protein;
AT5G60850	-1.06	-1.02	-0.35	-0.35	-0.35	-0.35	-0.35	-0.35	OBF BINDING PROTEIN 4OBP4 zinc finger protein
AT3G63160	-0.67	-0.98	-0.4	-0.4	-0.4	-0.4	-0.4	-0.4	Unknown
AT5G14780	-0.8	-0.98	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	FDH - NAD-dependent formate dehydrogenase
AT1G12900	-0.83	-0.98	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT 2
AT2G39730	-1.15	-0.98	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	RCA RUBISCO ACTIVASE
AT5G38430	-0.27	-0.97	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain)
AT4G25080	-0.7	-0.95	0	0	0	0	0	0	MAGNESIUM-PROTOPORPHYRIN IX METHYLTRANSFERASE
AT4G19160	-0.79	-0.93	-0.08	-0.08	-0.08	-0.08	-0.08	-0.08	Unknown
AT3G05900	-1.09	-0.93	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	neurofilament protein-related
AT5G26290	-1.83	-0.92	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	TRAF-like family protein
AT5G23660	-0.47	-0.91	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	homolog of the Medicago nodulin MTN3
AT2G39570	-0.64	-0.91	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	ACT domain-containing protein; FUNCTIONS IN: amino acid binding
AT2G29630	-1.22	-0.9	-0.12	-0.12	-0.12	-0.12	-0.12	-0.12	protein involved in thiamine biosynthesis.
AT5G18170	-0.52	-0.88	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14	-0.14	43 kDa alpha-subunit of the glutamate dehydrogenase with a putative mitochondrial transit polypeptide and NAD(H)- and alpha-ketoglutarate-binding domains
AT1G30360	-0.91	-0.88	0	0	0	0	0	0	early-responsive to dehydration 4 (ERD4)

ATCG00760	-1.45	-0.86	-0.73	-0.34	chloroplast ribosomal protein L36, a constituent of the large subunit of the ribosomal complex
AT5G69360	-0.88	-0.86	0.14	0.13	bifunctional [beta]-D-xylosidase/(alpha)-L-arabinofuranosidase required for pectic arabinan modification,
AT4G19530	-0.52	-0.85	0.29	-0.06	THR-NB-LRR resistance protein, Transient expression in tobacco induces cell death,
AT4G20890	-1.12	-0.85	0.07	0.34	TUBULIN BETA-9 CHAIN
AT3G05880	-0.27	-0.84	-0.35	-0.56	Induced by low temperatures, dehydration and salt stress and ABA
AT1G20940	-0.91	-0.84	-0.03	0.05	F-box family protein
AT1G14920	-1.3	-0.83	-0.19	0.27	GA GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE Similar to a putative transcription factor and transcriptional coactivators, Repressor of GA responses
AT4G12510	-0.63	-0.83	0.22	0.33	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
ATCG00770	-1.59	-0.83	-0.62	0.14	chloroplast 30S ribosomal protein S8
AT5G27950	-0.98	-0.82	0	0.15	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein;
AT3G27770	-0.61	-0.82	0.05	0.16	Unknown
AT4G27730	-0.65	-0.82	0.54	0.37	OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER 6
AT5G05170	-1.01	-0.8	0.17	0.38	CELLULOSE SYNTHASE 3
AT1G68010	-0.77	-0.8	-0.1	-0.12	hydroxypyruvate reductase
AT5G67480	-0.78	-0.75	-0.14	-0.12	BTB and TAZ domain protein
ATCG00580	-0.72	-0.75	-0.13	-0.16	PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER PROTEIN E
AT1G64355	-0.84	-0.74	0.09	0.13	Unknown
AT5G19770	-0.68	-0.73	0.39	0.34	tubulin 3
AT5G07010	-0.63	-0.73	-0.1	-0.2	sulfotransferase that acts specifically on 11- and 12-hydroxyjasmonic acid,
AT5G42020	-1.03	-0.73	0.74	1.03	Luminal binding protein (BiP2) involved in polar nuclei fusion during proliferation of endosperm nuclei.
AT5G64970	-0.51	-0.73	0.05	-0.17	FERRIC REDUCTION OXIDASE 6
AT5G06860	-0.9	-0.73	-0.06	0.1	POLYGALACTURONASE INHIBITING PROTEIN 1. Encodes a polygalacturonase inhibiting protein involved in defense response
AT1G75800	-0.89	-0.73	-0.22	-0.06	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein;
AT2G37040	-1.34	-0.72	0.38	1.01	PAL1 : phenylalanine ammonia-lyase 1
AT5G09660	-0.48	-0.72	-0.09	-0.38	peroxisomal NAD-malate dehydrogenase that is involved in fatty acid beta-oxidation through providing NAD to the process of converting fatty acyl CoA to acetyl CoA
AT1G14290	-0.49	-0.69	-0.39	-0.33	one of the two redundant sphingoid base hydroxylases (SBH). Involved in sphingolipid trihydroxy long-chain bas
AT2G45290	-1.06	-0.68	0.08	0.44	Transketolase
AT1G02340	-1.15	-0.68	-0.86	-0.39	light-inducible, nuclear-DHLH protein involved in phytochrome signaling,
AT1G64170	-0.72	-0.68	0.49	0.34	AT1CH16 CATION/H+ EXCHANGER 16 member of Putative Nar/H+ antiporter family
AT3G16660	-0.59	-0.66	0.03	-0.46	Pollen Ole 1 allergen and extensin family protein;
AT5G07000	-0.72	-0.63	-0.12	-0.03	SULFOTRANSFERASE 2B It may be able to act on structurally related jasmonates.
AT2G41560	-0.79	-0.63	0.14	0.39	calmodulin-regulated Cal(2+)-ATPase that improves salt tolerance in yeast AUTO-INHIBITED CA(2+)-ATPASE, ISOFORM 4
AT3G20820	-0.63	-0.63	-0.37	-0.36	Leucine-rich repeat (LRR) family protein; INVOLVED IN: signal transduction, defense response
ATCG00280	-1.22	-0.62	-0.54	0.07	PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER PROTEIN C
AT5G57660	-0.67	-0.61	-0.07	-0.03	CONSTANS-like 5 (COL5);
AT5G55050	-0.21	-0.61	0.71	0.52	GBSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT3G04730	-0.76	-0.6	-0.04	0.12	early auxin-induced (IAA16)
AT4G12490	-0.41	-0.6	0.82	0.33	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT4G10160	-0.75	-0.59	0.06	0.32	RING/U-box superfamily protein
AT5G43370	-1.31	-0.56	0.52	1.27	PHOSPHATE TRANSPORTER 1
AT4G30190	-0.69	-0.54	1.15	0.55	H(+)-ATPASE 2
AT3G55150	-0.62	-0.53	0.69	0.77	A member of EXO70 gene family, putative exocyst subunits, conserved in land plants.
AT1G51500	-0.68	-0.52	-0.18	-0.08	ABC TRANSPORTER FROM THE ABCG SUBFAMILY 12
AT5G05900	-0.69	-0.52	0.08	0.35	member of the CP90A family, a cytochrome P450 monooxygenase which converts 6-deoxocathesterone to 6-deoxocathesterone
ATCG00840	-0.89	-0.51	-0.54	-0.16	One of two chloroplast genes that encode chloroplast ribosomal protein L23, a constituent of the large subunit of the ribosome.....
AT5G66420	-1.13	-0.5	0.81	1.04	Unknown
ATCG00740	-0.81	-0.49	-0.51	-0.19	RNA POLYMERASE SUBUNIT ALPHA
AT4G30810	-0.75	-0.48	-0.08	0.2	serine carboxypeptidase-like 29 (scp29)
AT2G39800	-0.73	-0.45	-0.08	0.21	ATP5CDELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1P5C51

AT1G29200	-0.15	-0.43	-0.69	-0.99	O-tucosyltransferase family protein;
ATCG00780	-1.11	-0.42	-0.76	-0.97	chloroplast ribosomal protein L14, a constituent of the large subunit of the ribosomal complex
ATCG00810	-1.05	-0.4	-0.69	-0.94	chloroplast ribosomal protein L22, a constituent of the large subunit of the ribosomal complex
AT4G32480	0.02	-0.39	-0.76	-1.18	Protein of unknown function (DUF506)
AT5G54160	-0.9	-0.36	0.73	-0.96	ATOMT1, flavonol 3'-O-methyltransferase that is highly active towards quercetin and myricetin.
AT1G55090	-0.99	-0.36	-0.54	-0.99	NAD+ synthase (glutamine-hydrolyzing) activity, hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds
ATCG00850	-0.82	-0.36	-0.51	-0.95	chloroplast ribosomal protein L2, a constituent of the large subunit of the ribosomal complex
AT5G23980	-0.66	-0.36	-0.05	-0.93	ATPRO4_FERRIC REDUCTION OXIDASE 4
AT1G18860	-0.35	-0.33	-0.93	-0.91	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 61
AT1G65845	0.15	-0.31	0.82	-0.94	Unknown
AT5G17920	-0.66	-0.3	0.53	-0.93	cytosolic cobalamin-independent methionine synthase, involved in methionine regeneration via the activated methyl cycle (SAM cycle).
AT2G36690	-0.39	-0.23	1.01	-0.94	2-oxoglutarate [2OG] and Fe(II)-dependent oxygenase
AT2G46970	-0.34	-0.22	-0.7	-0.92	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 1
AT5G64100	-0.59	-0.01	1.06	-0.94	Peroxidase superfamily protein
AT2G25000	0.48	0.04	0.76	-0.92	Pathogen-induced transcription factor.
AT1G75830	0.09	0.04	-1.39	-1.48	Predicted to encode a PR (pathogenesis-related) protein. Belongs to the plant defensin (PDF) family
AT5G44420	0	0.05	-1.2	-1.49	LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 77
AT4G11890	0.79	0.16	0.06	-0.97	Protein kinase superfamily protein;
AT1G14880	1.84	0.16	0.87	-0.8	PLANT CADMIUM RESISTANCE 1 (PCR1)
AT3G05290	0.48	0.17	-0.15	-0.46	peroxisomal adenine nucleotide transporter, involved in fatty acid beta-oxidation
AT5G48430	-0.14	0.19	1.91	-0.92	serpin-type endopeptidase activity
AT1G74030	0.86	0.19	0.15	-0.92	Protein kinase superfamily protein
AT5G59970	-0.1	0.21	-0.39	-0.98	RING/U-box superfamily protein; FUNCTIONS IN: zinc ion binding
AT3G28510	0.81	0.21	0.24	-0.86	p-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT1G55170	0.79	0.22	0.34	-0.84	Unknown
AT3G46080	0.69	0.24	0.07	-0.89	C2H2-type zinc finger family protein
AT4G35180	1	0.31	0.54	-0.15	LYS/HIS TRANSPORTER 7
AT5G01610	0.8	0.31	0.14	-0.85	Unknown
AT1G72930	1.4	0.32	0.2	-0.87	Toll/interleukin-1 receptor-like protein (TIR) mRNA.
AT1G33960	1.13	0.33	0.07	-0.79	Identified as a gene that is induced by avirulence gene avrRpt2 and RPS2 after infection with <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
AT1G73800	0.88	0.34	0.2	-0.84	putative calmodulin-binding protein
AT1G28480	0.97	0.34	-0.22	-0.88	GRX480, a member of the glutaredoxin family that regulates protein redox state
AT3G48640	0.94	0.36	0.01	-0.97	Unknown
AT5G24530	0.84	0.37	-0.05	-0.84	DOWNY MILDEW RESISTANT 6
AT5G48540	0.79	0.37	0.41	-0.93	receptor-like protein kinase-related family protein;
AT3G25882	0.9	0.39	0.2	-0.91	kinase that physically interacts with NPR1/NIM1
AT5G22520	1.37	0.39	0.1	-0.88	Unknown
AT5G57060	0.66	0.41	-0.1	-0.86	Unknown
AT1G32310	0.72	0.42	-0.2	-0.85	Unknown
AT4G27280	1.11	0.43	-0.12	-0.79	Calcium-binding EF-hand family protein /
AT5G10800	0.72	0.45	0.04	-0.82	ATM55 carboxylesterase, similar to the SABP2 methyl salicylate esterase from tobacco. No action on methyl IAA, methyl JA, MeSA, MeGA4, or MeGA9 in vitro.
AT3G56400	1.51	0.46	0.09	-0.96	member of WRKY Transcription Factor. Activator of SA-dependent defense genes and a repressor of JA-regulated genes, WRKY70-controlled suppression of JA-signaling is partly executed by NPR1
AT2G17420	0.61	0.48	0.14	-0.91	NADPH-DEPENDENT THIOREDOXIN REDUCTASE 2
AT5G54610	1.2	0.48	0.49	-0.93	induced in response to Salicylic acid. Belongs to the ankyrin repeat protein family.
AT1G24575	0.83	0.48	-0.17	-0.91	Unknown
AT1G03340	0.76	0.49	0.02	-0.93	Unknown
AT1G54210	1.07	0.49	-0.05	-0.89	AUTOPHAGY 12 A (ATG12A), involved in autophagy, protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic pro....
ATMG01090	0.65	0.5	-0.3	-0.46	hypothetical protein
AT3G20510	1.19	0.51	0.16	-0.92	Transmembrane proteins 14c

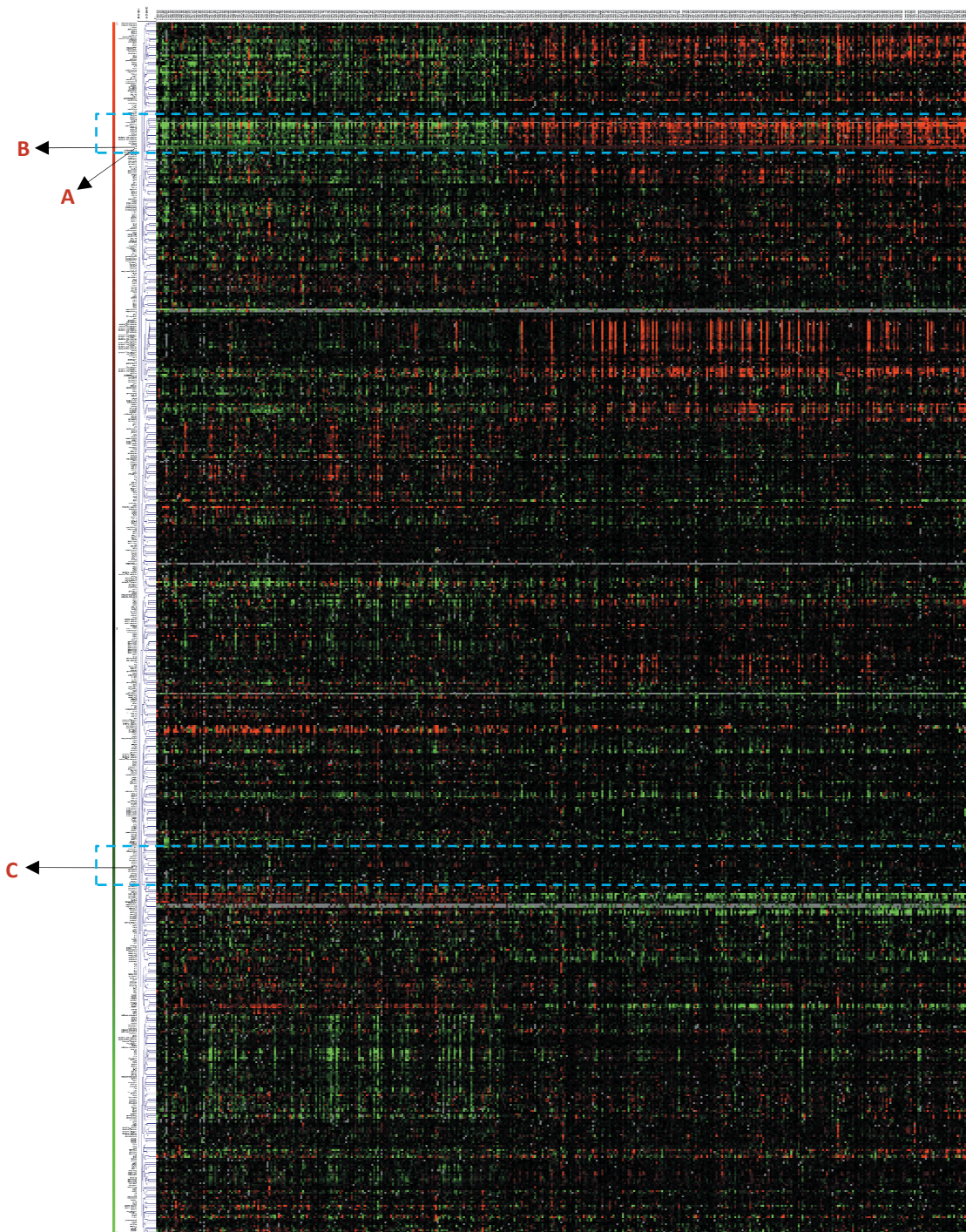
AT1G60740	0.7	0.53	0.12	0.06	Thioredoxin superfamily protein
AT3G26470	0.9	0.54	-0.04	-0.4	Powdery mildew resistance protein, RPW8 domain
AT1G66580	0.94	0.54		-0.51	senescence associated gene 24 (SAG24)
AT2G31080	0.77	0.85	0.08	0.14	transposable element gene; non-LTR retrotransposon family (LINE)
AT2G40113	0.64	0.55	0.11	0.02	Pollen Ole 1 allergen and extensin family protein;
AT1G67970	1.25	0.66	0.11	-0.33	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A8
AT2G14750	0.64	0.57	-0.1	-0.17	ADENOSINE-5'-PHOSPHOSULFATE (APS) KINASE 1 AKNI
AT4G26230	0.69	0.57	-0.03	-0.45	Ribosomal protein L31e family protein;
AT3G24500	1.15	0.88	0.44	0.14	One of three genes in A. thaliana encoding multiprotein bridging factor 1, a highly conserved transcriptional coactivator.
AT3G07090	0.9	0.88	-0.03	-0.35	PP2E putative thiol peptidase family protein
AT1G67920	0.8	0.59	-0.21	-0.42	Unknown
AT4E25020	1.06	0.6	0.43	-0.44	Unknown
AT3G60420	1.32	0.6	0.11	0.15	Phosphoglycerate mutase family protein
AT2G44290	1.09	0.6	0.23	-0.26	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 25 albumin superfamily protein
AT4E10170	0.8	0.6	-0.1	0.3	Unknown
AT5G18150	0.92	0.6	0.17	-0.15	Methyltransferase-related protein
AT1G72910	0.94	0.61	0.2	-0.19	Toll-interleukin-Resistance (TIR) domain-containing protein
AT3G50260	0.82	0.61	-0.12	-0.33	ATERFH01 CELL COOPERATIVELY REGULATED BY ETHYLENE AND JASMONATE 1 DEAR1 DRB AND EAR MOTIF PROTEIN 1
AT2G31090	0.95	0.63	-0.1	-0.42	Unknown
AT1G49610	0.75	0.63	-0.01	-0.13	F-box family protein
AT3G23570	0.74	0.63	-0.03	-0.44	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein;
AT3G54040	0.43	0.65	-0.05	0.17	PAR1 protein ?
AT4G10510	0.68	0.66	-0.14	-0.16	Subtilase family protein
AT3G22240	1.3	0.66	0.33	0.33	Unknown
AT1G07135	0.87	0.66	0.04	-0.17	glycine-rich protein
AT2G32190	0.67	0.67	-0.02	-0.02	Unknown
AT3G45730	1.01	0.67	-0.12	-0.46	Unknown
AT1G23200	0.76	0.67	0.1	0.01	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
AT2G43510	1.03	0.67	-0.1	-0.46	TRYPSIN INHIBITOR PROTEIN 1 Member of the defensin-like (DEFL) family which may function in defense against herbivory.
AT4G28290	0.89	0.67	-0.1	-0.32	Unknown
AT1G06575	0.86	0.67	0.05	-0.14	Unknown
AT3G09930	0.96	0.68	-0.1	-0.36	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT4G04800	0.74	0.69	-0.1	0.15	METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE B3
AT4G32870	1.14	0.7	0.58	0.14	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT5G06310	0.78	0.7	0.35	0.33	AT-POT1b.
AT3G10640	0.75	0.71	-0.08	-0.13	VP560.1
AT5G47740	0.49	0.71	-0.03	0.15	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
AT2G25735	0.94	0.71	-0.02	-0.25	Unknown
AT1G29670	0.55	0.71	0.01	0.17	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein;
AT5G50760	0.27	0.71	-0.11	0.33	SAUR-like auxin-responsive protein family
AT3G12910	0.39	0.71	-0.15	0.17	MAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
AT5G44610	0.37	0.71	-0.11	0.23	MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 18
AT4G19370	0.73	0.71	-0.06	-0.08	Unknown
AT2G37430	0.84	0.72	0.66	0.33	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein
AT1G56060	1.05	0.72	-0.16	-0.49	Unknown
AT5G11740	0.59	0.72	0.11	0.25	ARABINOGLACTAN PROTEIN 15
AT5G40370	1.04	0.72	0.07	0.24	Glutaredoxin family protein;
AT5G26690	1.33	0.72	0.04	-0.56	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT1G45145	1.06	0.73	-0.13	-0.46	TRX5: cytosolic thioredoxin that reduces disulfide bridges of target proteins by the reversible formation of a disulfide bridge between two neighboring Cys residues present in the active site



AT5G13190	1.15	0.74	0	-0.44	Unknown	
AT3G29000	1.04	0.75	0.09	-0.21	Calcium-binding EF-hand family protein	
AT5G54490	1.32	0.75	-0.06	-0.68	PROVID (PID)-binding protein containing putative EF-hand calcium-binding motifs	
AT2G04110	0.75	0.75	-0.06	-0.05	pseudogene of unknown protein	
AT1G53040	1.14	0.76	0.03	-0.36	Unknown	
AT5G19230	0.85	0.76	0.21	0.12	Glycoprotein membrane precursor GPI-anchored	
AT5G57010	0.66	0.76	-0.03	0.08	calmodulin-binding family protein	
AT1G64065	0.81	0.78	-0.14	-0.17	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	
AT3G10985	0.88	0.78	-0.29	-0.39	SAG20 AIR WOUND-INDUCED PROTEIN 12.ATWI-12 A senescence-associated gene whose expression is induced in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis.	
AT1G13520	0.55	0.79	0.09	0.34	Unknown	
AT1G62690	1.17	0.79	-0.04	-0.42	Unknown	
AT2G29460	0.97	0.8	-0.3	-0.47	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 22.GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 4.GST22GSTU4	
AT5G54500	0.84	0.8	0.14	0.11	flavin mononucleotide-binding flavodoxin-like quinone reductase that is a primary auxin-response gene	
AT1G47510	0.72	0.81	-0.08	0.02	INOSITOL POLYPHOSPHATE 5-PHOSPHATASE 11.AT5PTASE11	
AT1G18400	0.45	0.81	-0.29	0.07	BR ENHANCED EXPRESSION 1	
AT2G22320	0.81	0.82	-0.01	0	Unknown	
AT3G50900	0.89	0.84	-0.03	-0.09	Unknown	
AT2G38870	1.24	0.84	0.62	0.23	Predicted to encode a PR (pathogenesis-related) peptide that belongs to the PR-6 proteinase inhibitor family	
AT5G25940	1.07	0.84	0.03	-0.2	early nodulin-related	
AT5G57220	0.58	0.85	0.2	0.07	member of CYP81F, involved in glucosinolate metabolism. Mutants had impaired resistance to fungi.	
AT2G29490	0.72	0.85	-0.22	-0.48	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 19.GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 1.GST19.GSTU1	
AT1G53625	0.5	0.86	0.27	0.02	Unknown	
AT3G18240	0.93	0.86	0.18	0.11	Ribosomal protein S24/S35; mitochondrial	
AT4G28790	0.45	0.86	-0.22	-0.19	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	
ATMG00990	0.66	0.86	-0.51	-0.34	NADH DEHYDROGENASE 3	
AT1G05000	0.85	0.87	0.08	0.1	Phosphotyrosine protein phosphatases superfamily protein;	
AT5G57123	0.88	0.87	-0.2	-0.21	Unknown	
AT2G16900	0.67	0.87	-0.16	-0.05	phospholipase-like protein (PEARL 4) family	
AT3G13950	0.9	0.88	0.17	0.18	Unknown	
AT1G44750	0.81	0.88	-0.04	0.03	PURINE PERMEASE 11	
AT2G31945	1.02	0.88	-0.21	-0.34	Unknown	
AT1G32920	1.15	0.89	-0.16	-0.46	Unknown	
AT5G27760	1.03	0.89	-0.04	-0.18	Hypoxia-responsive family protein	
AT2G03505	0.9	0.9	-0.27	-0.27	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein	
AT5G50530	0.61	0.91	-0.18	0.12	CBS / octicosapeptide/Phox/Bemp1 (p81) domains-containing protein	
AT5G39670	1.3	0.91	0.25	-0.14	Calcium-binding EF-hand family protein	
AT4G21840	1.22	0.91	-0.02	-0.33	METHIONINE SUJFOXIDE REDUCTASE B8ATMSR88	
AT2G14560	1.88	0.92	0.16	0.79	LATE UPREGULATED IN RESPONSE TO HYALOPERONOSPORA PARASITICA	
AT3G56500	1.05	0.92	-0.32	-0.44	serine-rich protein-related	
AT3G661640	1.13	0.93	-0.29	-0.48	ARABINOGALACTAN PROTEIN Z0ATAGP20	
AT2G34490	0.65	0.93	-0.3	-0.08	protein with C2-sterol desaturase activity which catalyzes the conversion of both 24- <i>epi</i> -campesterol and $\beta$ -sitosterol to brassicasterol and stigmasterol, respectively, in the presence of NADPH	
AT2G04400	0.79	0.94	0.1	0.24	Adolase-type TIM barrel family protein	
AT3G18250	1.08	0.95	0.25	0.11	Putative membrane lipoprotein	
AT1E17520	0.98	0.95	-0.19	-0.22	Unknown	
AT1G57990	0.55	0.96	-0.02	0.08	PURINE PERMEASE 18.ATPUP18	
AT3G29250	1.16	0.97	0.22	0.03	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	
AT4G08350	0.65	0.97	0.44	0.25	GLOBAL TRANSCRIPTION FACTOR GROUP A2GTA02	
AT2G18660	1.98	0.98	0.17	-0.03	PLANT NATRIURETIC PEPTIDE A	
AT1G62760	0.65	0.98	-0.12	0.21	Plant invertase/pectin methyltransferase inhibitor superfamily protein	

AT5G46295	1.07	1	0.25	0.29	Unknown
AT1G23890	0.83	1.01	0.01	0.19	NHL domain-containing protein
AT1G58080	0.58	1.02	-0.07	0.37	ATATP-PTIATP PHOSPHOROSYL TRANSFERASE 1
AT2G35730	0.85	1.03	-0.16	0.32	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT4G24000	0.79	1.06	0.01	0.24	CELLULOSE SYNTHASE LIKE G2 ATCSG2
AT3G25250	0.94	1.06	-0.16	-0.04	OX1L OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE 1
AT1G54820	1.48	1.06	0.14	-0.28	Protein kinase superfamily protein
AT4G36500	1.23	1.08	0.05	-0.1	Unknown
AT5G57890	1.04	1.08	0.1	0.14	Glutamine amidotransferase type 1 family protein
AT3G50770	1.3	1.08	-0.07	-0.29	calmodulin-like 41 (CML41);
AT3G28210	1.41	1.09	-0.01	-0.34	PMZ SAP12 STRESS-ASSOCIATED PROTEIN 12 ABA responsive
AT1G49380	0.56	1.09	-0.16	0.37	cytochrome c biogenesis protein family
AT1G09932	1.2	1.1	0.3	0.2	Phosphoglycerate mutase family protein
AT4G14815	0.82	1.1	-0.12	0.34	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT5G50640	0.86	1.11	-0.19	0.35	CBS / octicosapeptide /Phox/Bemp1 (Pb1) domains-containing protein
AT2G43570	0.96	1.11	-0.14	0.31	CHITINASE, PUTATIVE
AT5G18290	1.09	1.12	-0.35	-0.22	SIP1B SMALL AND BASIC INTRINSIC PROTEIN 1B plant aquaporin
AT1G03850	1.18	1.12	-0.38	-0.34	Glutaredoxin family protein;
AT3G49780	0.83	1.12	0.09	0.39	ATPSK3 (FORMER SYMBOL)ATPSK4PHYTOSULFOKINE 4 PRECURSOR
AT3G51660	1.3	1.14	-0.09	-0.26	Tautomerase/MIF superfamily protein
AT1G14550	0.47	1.15	0.33	0.31	Peroxidase superfamily protein;
AT1G52900	0.78	1.15	-0.14	0.23	Toll-interleukin-Resistance (TIR) domain family protein
AT4G30230	0.74	1.16	-0.07	0.35	Unknown
AT1G27180	0.9	1.17	-0.25	0.33	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
AT1G74600	0.83	1.17	-0.01	0.34	Unknown
AT3G59080	0.87	1.18	0.14	0.44	DNA binding, aspartic-type endopeptidase activity
AT1G21310	0.53	1.18	0.2	0.35	EXTENSIN 3
AT5G64900	1.11	1.19	0.03	0.31	ATPEP1 ELICITOR PEPTIDE 1 PRECURSOR
AT5G13080	1.38	1.2	-0.13	-0.31	WRKY75 is one of several transcription factors induced during Pi deprivation.
AT5G07460	1.02	1.2	0.13	0.31	METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE 2
AT1G68390	0.75	1.2	0.04	0.39	Core-2/1-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
AT5G38895	1.1	1.22	0.18	0.3	RING/U-box superfamily protein
AT3G28930	1.41	1.23	-0.1	0.29	AVRRPT2-INDUCED GENE 2
AT2G46650	1.25	1.24	-0.04	0.35	member of Cytochromes b5
AT2G26560	0.67	1.24	0.05	0.31	lignin biosynthetic process
AT5G14700	1	1.24	-0.14	0.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT2G29350	1.26	1.26	-0.46	-0.46	senescence-associated gene SAG13 encoding a short-chain alcohol dehydrogenase
AT5G35525	1.46	1.31	0.92	0.77	PLANT CADMIUM RESISTANCE 2
AT3G60120	1	1.32	-0.56	-0.25	beta glucosidase 27 (BGLU27)
AT5G62150	1.22	1.32	0.3	0.32	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein
AT1G59510	1.32	1.34	-0.05	-0.08	CF9
AT4G28085	1.47	1.36	0.08	0.39	Unknown
AT3G53600	1.16	1.37	0.11	0.31	C2H2-type zinc finger family protein; FUNCTIONS IN: sequence-specific DNA binding transcription factor activity
AT2G29470	1.15	1.37	-0.52	-0.3	GSTZ1 GSTU3
AT1G14870	1.45	1.41	0.84	0.79	Plant cadmium resistance 2. PCR2 encodes a membrane protein involved in zinc transport and detoxification.
AT1G66700	0.65	1.42	-0.49	-0.27	A member of the SABATH methyltransferase gene family. Encodes PXM1T, a methyltransferase that methylates 1,7-paraxanthine.
AT2E00041	1.34	1.42	-0.13	0.34	Unknown
AT1G24909	1.18	1.43	0.2	0.45	Glutamine amidotransferase type 1 family protein anthranilate synthase activity
AT1G74590	1.02	1.44	0.03	0.33	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 10 GSTU10

AT1662130	1.24	1.44	0.23	0.53	AAA-type ATPase family protein
AT2639030	1.38	1.45	-1.06	-0.49	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein;
AT2645570	1.1	1.53	-0.01	0.12	CYP76C2 CYTOCHROME P450
AT1668450	1.28	1.53	-0.25	0	PIGMENT DEFECTIVE 337
AT4614630	1.45	1.57	0.3	0.12	GERMIN-LIKE PROTEIN 9
AT3601351	1.64	1.58	-0.06	-0.11	Unknown
AT1603220	1.01	1.59	-0.11	0.17	aspartic-type endopeptidase activity
AT1630135	1.22	1.6	-0.29	0.09	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 8
AT2614610	1.41	1.6	0.33	0.52	ATP11 PATHOGENESIS-RELATED GENE 1 PR 1
AT1614540	0.91	1.6	1.01	1.17	Peroxidase superfamily protein
AT3648890	1.57	1.62	-0.08	-0.10	MEMBRANE-ASSOCIATED PROGESTERONE BINDING PROTEIN 3 ATMAPB3 ATMP2
AT4628460	1.93	1.63	-0.1	-0.4	Unknown
AT4637060	0.89	1.67	-0.25	0.51	Paratin-related phospholipase A
AT1626380	0.94	1.68	0.64	1.13	FAD-binding Berberine family protein;
AT4630530	1.5	1.68	-0.04	0.14	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein;
AT4628088	1.52	1.7	-0.02	0.16	Low temperature and salt-responsive protein family
AT5643570	1.31	1.7	-0.07	0.21	Predicted to encode a PR (pathogenesis-related) peptide that belongs to the PR-6 proteinase inhibitor family.
AT2634500	1.16	1.7	-0.45	0.1	protein with C2-2sterol desaturase activity. The enzyme was shown to catalyze in the presence of NADPH the conversion of $\beta$ -sitosterol to stigmasterol, but not that of 24- <i>epi</i> -campesterol to brassicasterol
AT1627190	1.69	1.72	-0.07	0.10	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
AT5657510	1.45	1.76	-0.14	0.17	Unknown
AT1626410	0.68	1.78	0.57	1.17	FAD-binding Berberine family protein
AT4639940	0.87	1.78	0.55	0.56	ADENOSINE-5'-PHOSPHOSULFATE (APS) KINASE 2AKN2
AT3601420	0.44	1.78	-0.49	0.13	ALPHA-DOX1 : alpha-dioxygenase involved in protection against oxidative stress and cell death. Induced in response to SA and oxidative stress. Independent of NPR1 in induction by salicylic acid
AT5640990	1.14	1.84	-0.55	0.15	GLP1
AT3647540	2.01	1.85	-0.03	-0.10	Chitinase family protein
AT2615220	1.31	1.86	-0.43	0.14	Plant basic secretory protein (BSP) family protein
AT3648450	1.62	1.88	-0.26	-0.10	RPM1-interacting protein 4 (RIM4) family protein
AT4637390	0.1	1.91	-0.68	1.14	AUXIN UPREGULATED 3 Encodes an IAA-amidase synthase that conjugates Asp and other amino acids to auxin in vitro.
AT3616150	1.53	2.04	-0.09	0.12	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Nin hydrolases) superfamily protein;Peptidase T2, asparaginase 2
AT5603610	1.6	2.04	-0.21	0.23	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT2615170	1.43	2.05	-0.45	0.16	Plant basic secretory protein (BSP) family protein
AT2635980	1.66	2.06	0.48	0.19	NDPR1/HIN1-LIKE 10 : protein whose sequence is similar to tobacco harpin-induced gene (HIN1) and Arabidopsis non-race specific disease resistance gene (NDR1)
AT4620240	0.95	2.08	0.43	0.56	CYP71A27 CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 27
AT3660140	1.05	2.11	-0.28	0.27	BETA GLUCOSIDASE 30 BGLU30 DARK INDUCIBLE 2 DIN2 SENSENCE-RELATED GENE 2 SRG2 E
AT1644960	1.58	2.15	-0.56	0.01	SNARE associated Golgi protein family
AT5646950	1.81	2.19	-0.56	-0.10	Plant invertase/pectin methyltransferase inhibitor superfamily protein
AT1616140	1.2	2.3	1.06	0.59	CYP71A18 CYTOCHROME P450
AT4639950	1.39	2.34	-0.01	0.14	Belongs to cytochrome P450 and is involved in tryptophan metabolism. Converts Trp to indo-3-acetaldoxime (IAOX), a precursor to IAA and indole glucosinolates
AT3622600	1.99	2.76	0.37	1.14	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT1661820	1.64	3.02	0.3	0.17	beta glucosidase 46 (BGLU46) ; participate in a monoglucal glucoside/ $\beta$ -glucosidase system in lignification
AT4637290	2.51	3.07	0	0.16	Unknown



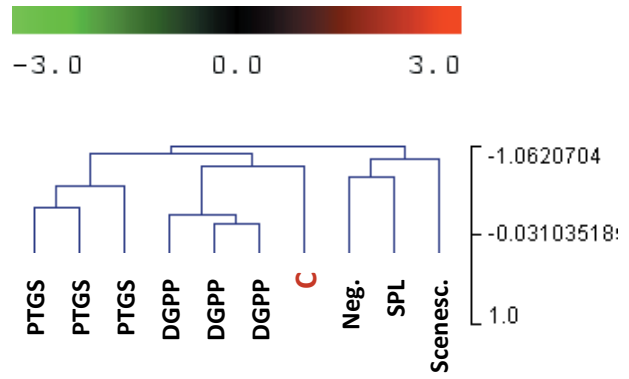
**Annexe 2. Comparaison des profils d'expression génique des conditions A, B et C avec les données transcriptomiques CATMA disponibles.** Il s'agit d'une classification hiérarchique confrontant nos données transcriptomiques avec celles disponibles dans la banque de données CATMA (647 au total). Une corrélation de Pearson a été appliquée grâce au logiciel MeV. Les conditions A, B et C correspondent aux conditions décrites dans la **Figure 55**. Les encadrés bleus indiquent le détail de la classification présentée en **Figure 59** (conditions A et B) et en **Annexe 3** (condition C).





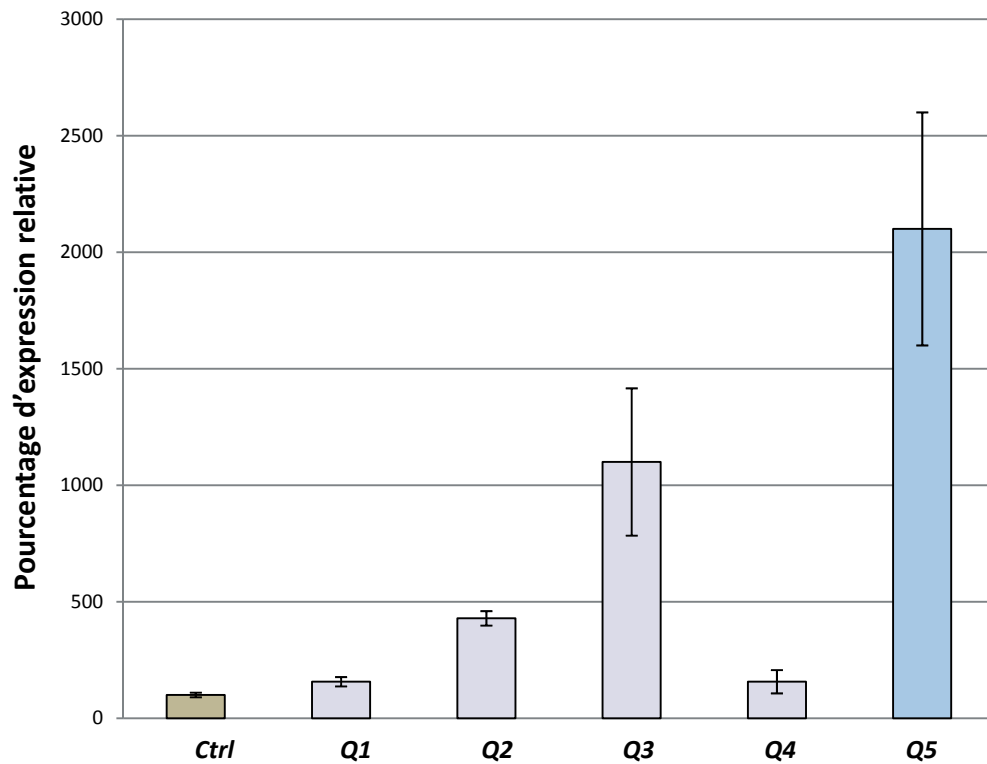
**A**

**B**



**Annexe 3. Comparaison du profil d'expression des gènes de la condition C (effet quinolinate) avec d'autres données puce à ADN CATMA.** A : carte de chaleur de l'HCL présentée en **Annexe 2**. Aucun profil d'expression clair ne semble mimer la condition C. B : détail de la figure A. Le nom des expériences fait référence à la nomenclature CATdb (voir Matériels et Méthodes). Les distances ont été calculées selon une corrélation de Pearson, par le logiciel Mev. DGPP : diacylglycérol pyrophosphate ; Neg. : contrôle négatif (expérience dans laquelle aucun gène n'est modulé au niveau transcriptionnel ; PTGS : *post-transcriptional gene silencing* ; Senesc. : analyse transcriptomique de la sénescence foliaire chez *Arabidopsis thaliana* ; SPL : *squamosa promoter binding protein-like*, facteur de transcription impliqué dans la floraison.





**Annexe 4. Mesures des niveaux de transcrits *QPT* chez les lignées surexpressseurs *35S::QPT*.** Les histogrammes représentent la moyenne de deux réplicats biologiques indépendants,  $\pm$  SE de deux mesures. *Q1* à *Q5* : lignées *35S::QPT*. Il s'agit d'une quantification relative par rapport au gène de référence *ACT2* (*At3g18780*). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression par rapport au *Ctrl*.





## Annexe 5

**Guérard, F., Pétriacq, P., Gakière, B., & Tcherkez, G.** (2011) Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the analysis of plant samples: A method for simultaneous screening of common cofactors or nucleotides and application to an engineered plant line. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**, 1117-1125.



Contents lists available at ScienceDirect

## Plant Physiology and Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/plaphy](http://www.elsevier.com/locate/plaphy)

## Research article

## Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the analysis of plant samples: A method for simultaneous screening of common cofactors or nucleotides and application to an engineered plant line

Florence Guérard<sup>a</sup>, Pierre Pétriacq<sup>b</sup>, Bertrand Gakière<sup>b</sup>, Guillaume Tcherkez<sup>b,c,\*</sup><sup>a</sup> Plateforme Métabolisme-Métabolome IFR87, Batiment 630, Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France<sup>b</sup> Institut de Biologie des Plantes, CNRS UMR 8618, Batiment 630, Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay Cedex, France<sup>c</sup> Institut Universitaire de France, 103 Boulevard Saint-Michel, 75005 Paris, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 May 2011

Accepted 2 June 2011

Available online xxx

## Keywords:

LC–MS

NAD

*Arabidopsis*

Nicotinate

Nucleotides

## ABSTRACT

Intense efforts are currently devoted to improve plant metabolomic analyses so as to describe more accurately the whole picture of metabolic pathways. Analyses based on liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (LC–TOF) are now widely distributed among plant science laboratories. However, the use of reliable, sensitive LC–TOF methods to identify and quantify micromolar or infra-micromolar key metabolites is often impeded by the sensitivity of the technique to sample preparation or chromatographic conditions. Typically, the sample matrix has a substantial influence on ionization efficiency and therefore, on the detectability of such compounds. Here, we describe a new method to analyze simultaneously 23 nucleotides and cofactors from plant extracts, taking advantage of solid-phase extraction (SPE) prior to injection. The influence of common *m/z* fragments in several metabolites and adducts is considered. We applied this method to characterise metabolic intermediates of NAD biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, using a wild-type and an engineered transgenic plant line that produces bacterial quinolinate phosphoribosyl transferase (*nadc*). We show that sample pre-purification with SPE is strictly required not only for compound quantification and identification but also to allow ionization of matrix-sensitive compounds (e.g. nicotinamide) or alleviate fragmentation of others (e.g. NAD). When exogenous substrate quinolinate was infiltrated into *Arabidopsis* leaves to increase the natural content in downstream metabolites, a clear correlation between intermediates of NAD biosynthesis was seen, showing the accuracy of our method for quantification in biological samples. *Nadc* plants only showed very modest changes in NAD-related metabolites and furthermore, they were associated with slightly lower photosynthetic performance and ATP production.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

A growing number of studies take advantage of metabolomic methods to provide a general picture of plant metabolism. Several techniques (NMR, GC–MS, LC–MS) have been used to carry out non-targeted metabolomic analyses [1]. Multivariate statistics further allows the identification of metabolites that discriminate

sample groups (for a recent application to LC–TOF data in plants, see [2]). However, all of these methods have advantages and disadvantages. Although widely used, NMR is insensitive to variations in trace constituents. GC–MS is not adapted to compounds with high molecular weight. Nowadays, LC–MS techniques are seen as essential, due to their inherent benefits in sensitivity and selectivity [3,4]. Specific applications of LC–MS methods to complex plant metabolites have been published in the past decade (e.g. naphthodianthrones, [5]; fungicide, [6]; metatonin, [7]; alkaloids, [8]; amino acids, [9]), including plant hormones [10,11]. Nevertheless, one remaining conundrum of plant metabolomics is targeted metabolomic analyses on large sample trials. In fact, satisfactory results may only be achieved under specific chromatographic conditions, possibly after cleanup treatments. In other words, while the separative step (LC) is crucial to enhance both sensitivity and selectivity, a further pre-purification step may be

**Abbreviations:** AdoHCys, S-adenosyl homocysteine; ADPG, ADP-glucose; Glut, glutathion; Me-THF, methyl-tetrahydrofolate; NaMN, nicotinate-D-ribonucleotide; NaAD, deamino-NAD<sup>+</sup>; NMR, nuclear magnetic resonance; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; SAM, S-adenosyl methionine; THF, tetrahydrofolate; TOF, time-of-flight mass spectrometry; UDPG, UDP-glucose; WUE, water-use efficiency.

\* Corresponding author. Institut de Biologie des Plantes, Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay cedex, France. Tel.: +33 1 69 15 33 79; fax: +33 1 69 15 34 24.

E-mail address: [guillaume.tcherkez@u-psud.fr](mailto:guillaume.tcherkez@u-psud.fr) (G. Tcherkez).

0981-9428/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

doi:10.1016/j.plaphy.2011.06.003

Please cite this article in press as: F. Guérard, et al., Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the analysis of plant samples: A method for simultaneous screening of common cofactors or nucleotides and application to an engineered plant line, Plant Physiology and Biochemistry (2011), doi:10.1016/j.plaphy.2011.06.003



yield an enzyme located in the chloroplast [14]. NaMN synthesis may also involve nicotinamide or nicotinate recycling with nicotinate phosphoribosyl transferase (NaPRT, EC 2.4.2.11). Nevertheless, the contribution of pyrimidine recycling through nicotinate and that of *de novo* synthesis of NAD *in planta* remains uncertain and this has been discussed elsewhere [15]. In the present paper, we use the transgenic *nadc* line to exemplify the use of the LC–TOF techniques to detect intermediates of NAD metabolism and examine the subtle metabolic effects of an increased NaMN-synthesis capacity.

We demonstrate that nucleotide and cofactor quantification strictly requires the use of pre-purification, SPE-based methods before injection for LC–TOF analysis. Typically, most if not all metabolites including key intermediates such as nicotinamide and NaMN, show a strong matrix-dependent behaviour, with negligible ionization when the SPE-based cleanup treatment was omitted. In the specific case of NAD biosynthesis intermediates, the formation of fragments formed upon ionization (nicotinate, 123.03 *m/z* neutral) is very common and therefore, the interpretation of mass spectra is only possible under rigorous chromatographic conditions. Wild-type and *nadc* plants did not show significant differences in NaMN and NAD contents. *Nadc* plants were rather suspected to have an altered ATP/photosynthetic homeostasis.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material and quinolinate infiltration

*Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 was used for this study. *Arabidopsis* seeds of transgenic vector control (referred as 'wild-type' in the present article) and *nadc* lines [16] were sown in artificial soil pot, followed by a 4 °C stratification for 2 days. Plants were then germinated and grown in a controlled-environment growth chamber under a day/night regime of 8 h/16 h, 20/18 °C, a light intensity of 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR (at leaf level) and 65% humidity. Nutrient solution (Hydrokani™ C2) was given twice per week. Whole leaves of 5-week-old plants were infiltrated in the middle of the photoperiod with 5 mM quinolinate pH 6, using a needle-free 1-mL syringe. 96 h later, the same leaves were sampled, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until further analysis.

### 2.2. Extraction and SPE cleanup

About 500 mg frozen plant material were ground in a mortar using liquid nitrogen, with 1 mL perchloric acid 17%. After centrifugation (14,000 g, 20 min, 4 °C) the supernatant was neutralized with potassium hydroxide, adjusted to pH 7 with potassium bicarbonate and centrifugated (14,000 g, 20 min, 4 °C). The resulting supernatant was then separated in two aliquots of 550  $\mu\text{L}$ . One of them was spin-dried (speed-vac) directly and in the following, is referred as 'crude' extract. The other aliquot was cleaned up with two solid-phase extractions, using the columns Strata-X-C and Strata-X-AW (Phenomenex, Le Pecq, France). 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  50% were added to the extract that was then loaded on the Strata-X-C column (flow rate 1 mL  $\text{min}^{-1}$ ) after conditioning with methanol and water. The loading fraction was collected in a tube. The column was washed with 1 mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.1% and the washing fraction was collected. Elution was carried out with  $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mL 5/25/70 v/v/v, 0.5 mL 10/25/65, 1 mL 20/25/55; flow rate 1 mL  $\text{min}^{-1}$ ). The eluate was collected in an Eppendorf tube. Both loading and washing fractions were gathered and 500  $\mu\text{L}$  phosphate buffer (0.01 mol  $\text{L}^{-1}$ ) were added. The resulting buffered fraction was loaded (1 mL  $\text{min}^{-1}$ ) on the Strata-X-AW column after conditioning with pure methanol, methanol/formic acid/water

(2/25/73 v/v/v) and then phosphate buffer. The column was then washed with 1 mL phosphate buffer. Elution was carried out with  $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mL 5/25/70 v/v/v, 0.5 mL 10/25/65, 1 mL 20/25/55; flow rate 1 mL  $\text{min}^{-1}$ ). The eluate was collected in an Eppendorf tube. The two eluates (C and AW) were spin-dried (speed-vac) and used immediately for LC–TOF analysis.

### 2.3. LC–TOF analyses

Spin-dried extracts were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  ammonium acetate (pH 6.8, 5 mmol  $\text{L}^{-1}$ ), centrifuged (8000 g, 4 °C, 20 min) and the supernatant was transferred in a glass vial. 10  $\mu\text{L}$  Ara-C (cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside, 0.1 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) were added as internal standard. Samples were injected in the UPLC Acquity equipped with the column UPLC-HSS T3 (2.1  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) (Waters, Guyancourt, France) under an ammonium acetate/methanol gradient (99/1-0/100%, 6 min). The UPLC was connected to the injection orifice of the mass spectrometer via a capillary tube and a 6-port valve. The flow rate was 0.4 mL  $\text{min}^{-1}$ . Electrospray mass spectrometry was carried out with the MicroTOF II (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) with  $\text{N}_2$  as a spray gas, at 195 °C (drying temperature), 8.5 L  $\text{min}^{-1}$  (gas flow) and 4 bars, upon positive or negative source ionization (–4500 or 3700 V capillary voltage, respectively; –500 V interface voltage). Resolution parameters were adjusted to achieve optimal mass resolution in the mass range 50–800 amu. Mass spectra were recorded with an acquisition frequency of 40 Hz. Data were acquired and processed using the softwares MicroTOF-Control, Data-Analysis and Target-Analysis (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). All compounds analysed here were measured and calibrated with pure standards purchased at Sigma–Aldrich/Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France).

### 2.4. $^{31}\text{P}$ -NMR analyses

NMR measurements were carried out from perchloric acid extracts prepared as described above. NMR analyses were carried out as described previously [17]. Briefly, spectra were obtained using a Bruker spectrometer (AMX 400, Bruker, Wissembourg, France) equipped with a 10-mm multinuclear probe tuned at 161.9 MHz ( $^{31}\text{P}$ ). The assignment of  $^{31}\text{P}$  resonance peaks was carried out according to [18]. Spectra were referenced to methylene diphosphonic acid (16.38 ppm). To determine the amount of ATP, ADP and AMP in perchloric extracts, a calibration of peak intensity was performed with known amounts of standards.

### 2.5. Physiological measurements

Photosynthetic measurements were carried out using an open gas-exchange system Li-Cor 6400 (Lincoln, USA). After 15 min dark-adaptation, the light was turned on (300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , blue-red LED light source) and after 40 min stabilization, photosynthetic measurements were done, under 400  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ , 21%  $\text{O}_2$ . Temperature and relative humidity were maintained at 25 °C and 60%, respectively. Inlet water vapour was monitored using a dew point generator Li-610 (Li-Cor). After 2 h light, the light was turned off and steady dark-respiration rates were measured.

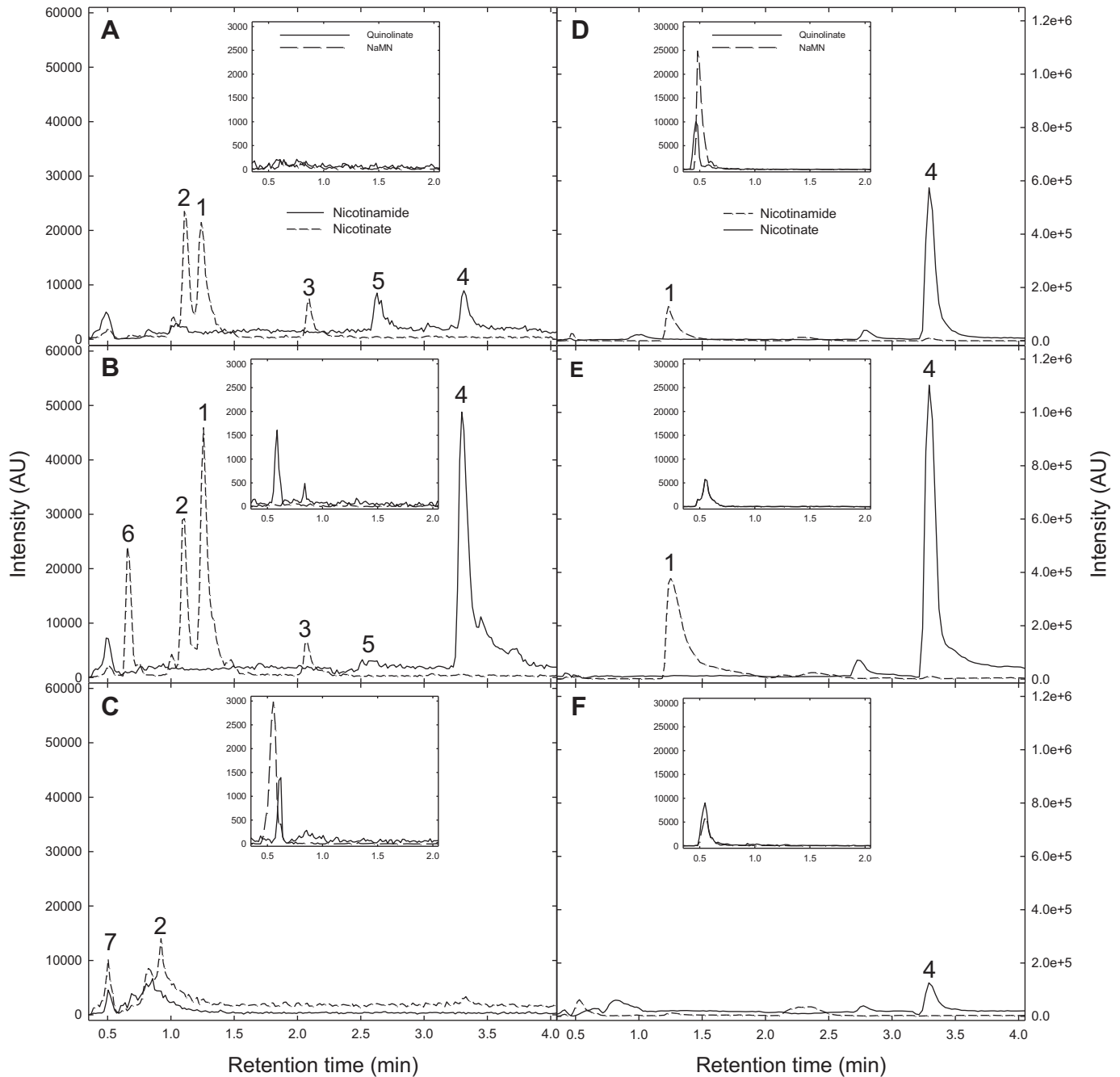
## 3. Results

### 3.1. Effect of solid-phase extraction on LC–TOF analyses

Biological samples were extracted with perchloric acid and then either used directly as crude extracts or pre-purified with SPE. The SPE cleanup treatment consisted in two steps (strong cation

exchange and weak anion exchange). Three fractions were compared for LC–TOF analysis: crude extract, first eluate (fraction C) and second eluate (fraction AW) (Fig. 2A–C). SPE was also carried out on a standard solution of pure compounds ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Fig. 2D–F). In the case of nicotinate and nicotinamide, the mass-specific chromatograms clearly show that ionization was enhanced in the first fraction (C) compared to the crude extract (Fig. 2D and E) while the second fraction (AW) was nearly devoid of

these compounds. By contrast, both quinolinate and NaMN were equally distributed in the two fractions, with a comparable signal (sum of signals of both fractions) in pre-purified and crude extracts. In leaf samples, the matrix effect was clear, with nearly no quinolinate and NaMN mass signal at all in crude extracts (Fig. 2A, inset), but visible peaks in both fraction C (mainly, quinolinate) and AW (mainly, NaMN). The influence of the sample matrix was also very neat with nicotinamide that showed a ten-fold increase of the mass



**Fig. 2.** LC–TOF chromatograms showing the specific ion mass of nicotinamide ( $[M + H]^+$  123.05, solid), nicotinate ( $[M + H]^+$  124.04, dashed), quinolinate ( $[M - H]^-$  166.01, solid, inset) and nicotinate-D-ribonucleotide NaMN (here, the decarboxylated fragment of NaMN,  $[M - H]^-$  290.04, is shown; dashed, inset) from a typical *Arabidopsis* leaf sample (A–C) or a standard solution of pure compounds at  $50 \mu\text{M}$  (D–F). Chromatograms were obtained from the raw fraction (A and D), after the first solid-phase extraction (B and E) or after both solid-phase extractions (C and F). For both *Arabidopsis* and standard samples, the concentration of original products is preserved so that intensities may be compared between A–C panels and D–F panels. Peaks are numbered as follows: 1, nicotinate; 2, isonicotinate; 3, nicotinate fragment from NaAD; 4, nicotinamide; 5, nicotinamide fragment from NAD; 6, *ortho*-methoxyphenol fragment ( $124.04 \text{ m/z}$ , same mass as nicotinate) from a combrestatin-like stilbenoid phenol; 7, nicotinate fragment from quinolinate. Analyses were performed by positive (main panels) or negative (insets) electrospray ionization.

signal between crude extract and fraction C. It should be noted that an important ion at  $m/z$  124.04  $[M + H]^+$  was observed. It was associated with rather different compounds that were distinguishable on a retention time basis: nicotinate, isonicotinate, and a fragment from a stilbene phenol of the combrestatin family. Similarly, NAD ionization induced the production of nicotinamide fragments ( $m/z$  123.05), mainly in the crude extract (Fig. 2A).

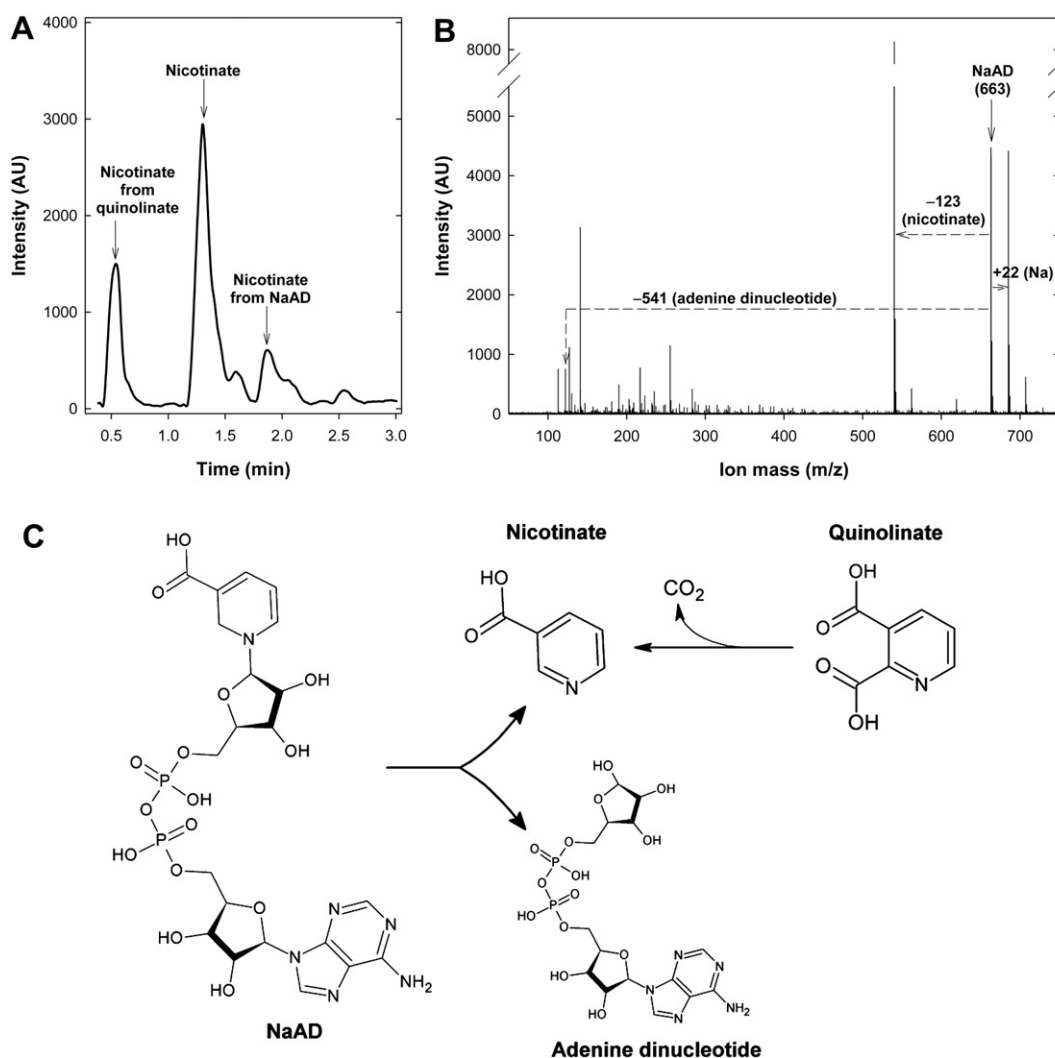
### 3.2. Fragmentation pattern of NaAD

The typical chromatographic pattern of ion  $m/z$  122.02 (nicotinate) is shown in Fig. 3A. Between 0.5 and 2.5 min, three peaks were seen, namely, nicotinate from decarboxylating quinolinate fragmentation, endogenous nicotinate, and nicotinate from the rupture of one C–N bond in deamino-NAD (NaAD) (Fig. 3C). The full scan mass spectrum at 1.8 min (retention time of NaAD) is shown in Fig. 3B. Clearly, the mass signal of the heavy fragment (adenine dinucleotide) at  $m/z$  540.06 was far higher than that of NaAD *per se*. In addition, the sodium adduct of NaAD was significant. The light fragment of NaAD at  $m/z$  122.04 (nicotinate) is of little importance because of its low ionization efficiency in the negative electrospray mode. For all these reasons, the quantification of NaAD was not

straightforward. In the following, the NaAD content was estimated using the sum of ion masses associated with NaAD, adenine dinucleotide and the sodium adduct ( $[NaAD + Na^+ - 2H]^+$ ). Similarly, NAD is fragmented into nicotinamide ( $m/z$  123.05, Fig. 2) and in what follows (Fig. 5), the NAD content takes into account this fragment.

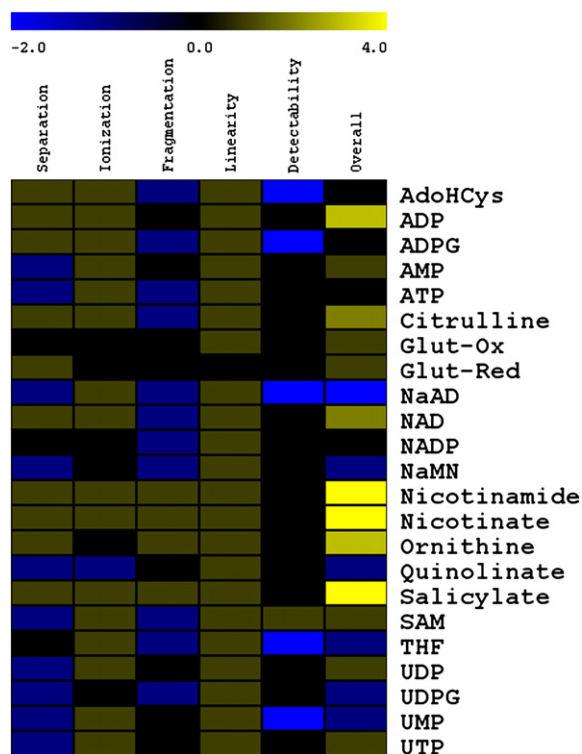
### 3.3. Performance of the SPE–LC–TOF method

As an aid in evaluating the feasibility of analyses for the metabolites of interest, the performance of the SPE–LC–TOF technique was scored. Five criteria were used here and scores are summarized in Fig. 4: (i) separation: chromatographic performance was considered as ‘poor’ when the natural variation in retention time over 5 injections of biological samples was larger than 0.05 min, ‘medium’ when between 0.02 and 0.05 min and ‘good’ when below 0.02 min (ii) ionization: ionization efficiency was considered as ‘poor’ when the major mass signal after injecting a standard mixture at  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  was lower than  $10^3$  (AU), ‘medium’ when between  $10^3$  and  $10^4$ , and ‘good’ when above  $10^4$ . (iii) fragmentation: resistance to fragmentation or adduct production was considered as ‘poor’ when both fragments and adducts



**Fig. 3.** LC–MS chromatogram based on mass 122.02 ( $[M-H]^-$ , nicotinate) (A), mass spectrum and fragmentation pattern (B) and chemistry (C) of deamino-NAD (NaAD). In A, endogenous natural nicotinate is well separated from nicotinate coming from NaAD and quinolinate fragmentation. In B, ionization causes NaAD fragmentation into nicotinate and adenine dinucleotide, as shown in C. NaAD ions ( $[M-H]^-$ ,  $m/z$  663.08) also form a sodium adduct.

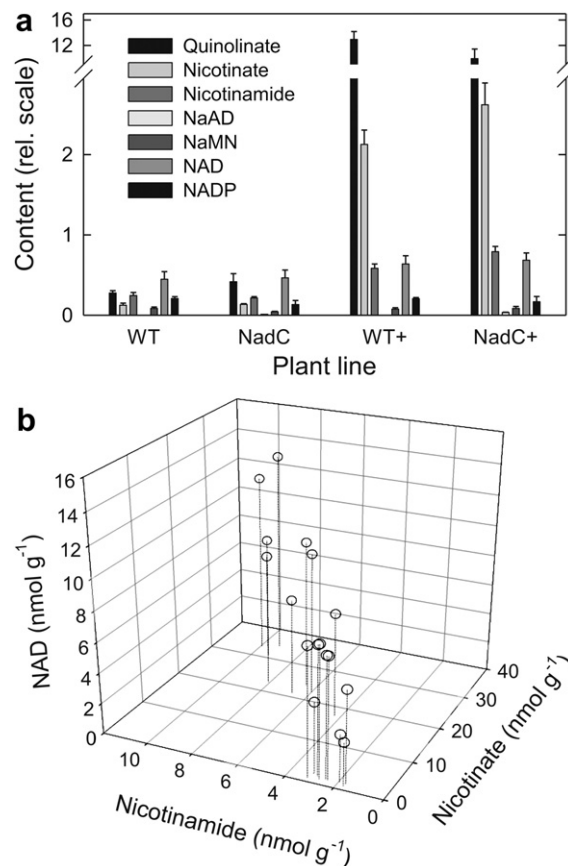




**Fig. 4.** Summary of the LC–TOF MS performance for the analysis of selected metabolites. The ionization mode is recalled on the left (P, positive; N, negative). In each cell, the score associated with the parameter of interest (columns) is indicated with colors (color scale on top). Scores are incremented (–1, 0, 1) with the following thresholds: separation (natural variation of retention time), 0.05 and 0.02 min; ionization (intensity of the peak when injecting a standard solution at 30  $\mu\text{M}$  after SPE-based preparation),  $10^3$  and  $10^4$ ; linearity (regression coefficient of calibration curves), 0.90 and 0.95. For fragmentation, values of –1, 0 and 1 correspond to: occurrence of fragments and adducts, occurrence of adducts, no fragmentation nor adduct, respectively. For detectability, –2, –1, 0 and 1 correspond to: never observed, needs SPE and found in two SPE fractions, needs SPE and found in one single fraction, does not need SPE. The overall score (right) is the sum of the five other scores. See the text for further details. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(mainly  $\text{Na}^+$ ) were observed, ‘medium’ when adducts only were observed, and ‘good’ when no adduct nor fragment were obtained. (iv) linearity was considered as ‘poor’ when a calibration curve with standard mixtures ( $10\text{--}50\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ) had a correlation coefficient below 0.9, ‘medium’ when between 0.9 and 0.95, and ‘good’ otherwise. (v) detectability: the metabolite was considered as ‘easy to detect’ when well visible in the crude biological extract, ‘moderately easy to detect’ when visible in one single SPE fraction, ‘difficult to detect’ when visible in the two SPE fractions (no specific elution), and ‘very difficult’ when hardly visible even after SPE preparation. Numerical scores were incremented between –2 and 1.

Six compounds were found to be associated with a modest performance: NaAD, NaMN, quinolinate, tetrahydrofolate, UDP-glucose and UMP, mostly because of a bad detectability. In addition to fragmentation issues (Fig. 3), NaAD was also found to have a variable chromatographic retention time. In biological samples, the intrinsically low abundance of these compounds was partly the cause of their insufficient detectability. Glutathione was also associated with a modest overall score. It was even lower when both reduced and oxidized glutathione were compared, because the redox ratio was not preserved by our method (data not shown). In other words, both the SPE cleanup and rearrangements in the ion source oxidized reduced glutathione by up to 80%. Taken as a whole, the method described here was mostly suitable for semi-



**Fig. 5.** Leaf content in metabolites involved in NAD biosynthesis in wild-type and *nadC* lines. Metabolites were quantified on leaves collected in the light after infiltration with exogenous quinolinate (+) or Mock buffer. The chemical structure of metabolites is recalled in Fig. 1. In **a**, metabolites are expressed relative to an internal standard used for LC–MS analyses (cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside). Mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ . In **b**, absolute leaf content ( $\text{nmol g}^{-1}$  FW) of key intermediates are shown, all samples in the same plot. The linear regression between nicotinate and NAD is significant ( $F = 12.4$ ,  $p < 0.005$ ) and yields  $y = 5.97 + 0.14x$  ( $R^2 = 0.45$ ).

quantitative purposes, not to examine metabolic ratios of absolute concentrations. That said, the linearity of ion signals upon calibration curving is generally good (maximal score of +1 in all instances except for reduced glutathione). Absolute quantification may thus be carried out provided metabolites of interest are detected in samples.

#### 3.4. NAD biosynthetic intermediates in *Arabidopsis* samples

Semi-quantitative analysis of wild-type and *nadC* plant leaves was performed with the present method. The results are shown in Fig. 5a in which metabolic amounts are expressed relative to the internal standard Ara-C (cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside). We further took advantage of calibration curves to calculate absolute concentration in nicotinate, nicotinamide and NAD (Fig. 5b). The two plant lines did not show any significant difference in endogenous NAD biosynthetic intermediates. Upon quinolinate addition (microinfiltrated into leaves), there was also a very slight but insignificant difference in downstream metabolites such as NAD, nicotinamide and NaMN between plant lines. NaAD, that was not detectable at all in the wild-type, was visible (still, extremely low) in *nadC* plants after quinolinate addition. Leaf quinolinate accumulated upon quinolinate feeding, clearly showing the poor utilization of this substrate (Fig. 5a, right hand side). Importantly,



quinolinate was substantially converted to nicotinate, the content of which increased 15-fold after quinolinate addition. Nicotinate was in turn amidated, as indicated by the production of nicotinamide (2–3-fold increase).

When all the samples were gathered in the same plot showing absolute concentrations, there was a positive, nearly linear relationship between nicotinate, nicotinamide and NAD (Fig. 5b). The slope of the relationship between NAD and nicotinate was of 0.14, suggesting that the commitment ratio of added quinolinate to NAD biosynthesis was 14% only of that to degradation to nicotinate.

### 3.5. Photosynthetic and $C_1$ metabolites in *Arabidopsis* samples

Metabolites involved in (de)methylations (such as photorespiratory glycine decarboxylation to serine, SAM and THF) and in photosynthesis, and ATP were quantified in wild-type and *nadc* samples (Fig. 6A and B). Furthermore, photosynthetic activity (A) was measured under standard conditions ( $400 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) as well as the photochemical yield ( $\Delta F/F_m'$ ) and intrinsic water-use efficiency, the ratio of assimilation to stomatal conductance to  $\text{CO}_2$  (WUE) (Fig. 6C). There was no significant difference in photosynthetic intermediates (UDG-glucose, RuBP) and accordingly, the photosynthetic activity was rather similar. Still, photosynthesis was slightly but insignificantly lower in *nadc* leaves ( $7.8 \pm 0.6$  vs  $8.4 \pm 0.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Similarly, both WUE and the photochemical yield were visibly but insignificantly lower in *nadc* leaves, unlike the ATP content that was clearly smaller (Fig. 6B). The amount in S-adenosyl methionine was similar while the amount of methyl-THF (5-methyl- $\text{H}_4$ folate) was visibly higher (non-methylated THF was not detected at all in samples), suggesting that the balance between methylations and demethylations was altered in *nadc* plants.

## 4. Discussion

### 4.1. Is the LC–TOF method suitable for analyses of NAD-related metabolites and cofactors?

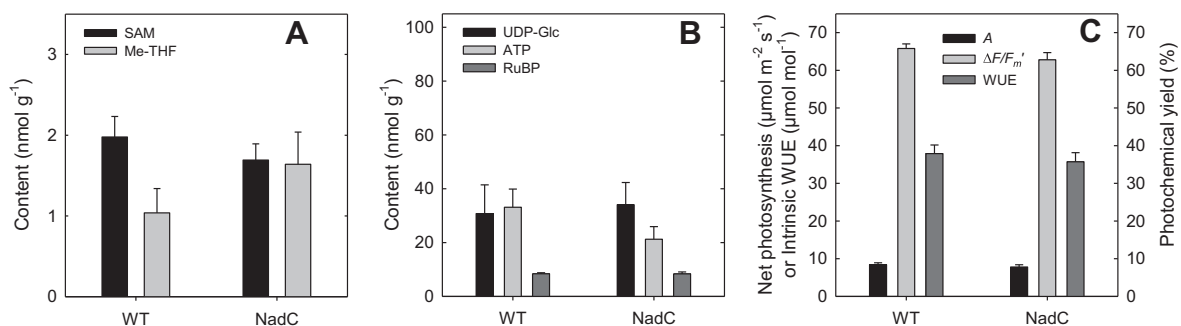
In an effort to tackle the *Arabidopsis* metabolome, up to 300 metabolites are commonly detected by using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) technology. Although it has been shown that the number of detected peaks in typical GC/MS plant chromatograms can be multiplied by deconvolution algorithms [19], the *de novo* identification of GC/MS peaks remains cumbersome. Developing LC/MS-based methods can potentially provide greater flexibility and high peak capacity, including the scale-up for peak identification. Polar and water-soluble components can be separated and quantified by replacing classical normal-phase

chromatography with hydrophilic interaction chromatography. Past works dealt with optimization of LC/MS conditions for quantitation of specific compound classes such as saponins, lipids, flavonoids or carotenoids (for a specific discussion, see [13]). Most studies focused on nucleotides or ribosylated metabolites were carried out from human or animal samples (see, e.g., [20,21]). Little has been done to develop targeted metabolomics on nucleotide- or NAD-related compounds as well as heavy key compounds involved in major metabolic pathways such as photorespiration and photosynthesis.

Here, we optimized a method for the analysis of such compounds. Our LC/MS technique involves an SPE-based pre-purification step, followed by liquid chromatography and electrospray ionization for time-of-flight mass spectrometry. It appeared that the technique allows the quantification of most intermediates of NAD biosynthesis, including nicotinamide and nicotinate. However, some metabolites such as NaAD or ADP-glucose were hardly detected, due to their low abundance in *Arabidopsis* leaves. Furthermore, fragmentations made quantifications more difficult and so was the case of NaAD, that was degraded into nicotinate upon ionization. Still, we obtained a good linearity response for most metabolites ( $r^2 > 0.95$ , Fig. 4) and a rather good repeatability in biological samples (Fig. 5a).

The specific addition of quinolinate in biological samples was clearly detected and repeatable (Fig. 5a) and close metabolites correlated linearly (Fig. 5b). The absolute content of THF, a low abundance metabolite, was found here of  $1\text{--}2 \text{ nmol g}^{-1} \text{FW}$  (Fig. 6) and this agrees with previous quantification based on radioisotopic assays [22]. We further carried out a comparison of ATP, ADP and AMP absolute content and phosphorylation ratios using  $^{31}\text{P}$  NMR and LC–TOF on the same perchloric extracts (Table 1). Clearly, absolute contents were satisfactorily close, with a typical ATP/ADP ratios of around 2 and very large ATP/AMP ratios [23]. We therefore conclude that the quantification of most metabolites examined here appeared to be accurate.

We nevertheless recognize that the method is probably best adapted for relative quantification, similar to most metabolomic techniques that use contents relative to an internal standard (as in Fig. 5a). That is, measurements of absolute metabolite contents were accurate for most metabolites but not for glutathione (due to oxidation) or ornithine (due to a relatively bad ionization, Fig. 4). Furthermore, absolute quantification often requires the evaluation of recovery and ionization efficiency of each specific compound using addition of deuterated standards [24] (for a specific application to hormones, see [10] and references therein). Still, deuterated standards may be unavailable for several compounds (NaAD, NaMN). In addition, chromatographic H/D isotope effects may occur and complexify elution patterns [25].



**Fig. 6.** Compounds involved in  $C_1$ -metabolism (A), photosynthetic metabolites (B) and photosynthetic parameters (C) in wild-type (WT) and *nadc* *Arabidopsis* leaves: S-adenosyl methionine (SAM), methyl-tetrahydrofolate (Me-THF), UDP-glucose (UDP-Glc), ATP, ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP). Photosynthesis (A), photochemical yield in the light ( $\Delta F/F_m'$ ) and intrinsic water-use efficiency ( $WUE = A/g_s$ ) were measured under  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR, 21%  $\text{O}_2$ ,  $400 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ ,  $25^\circ\text{C}$  and 60% relative humidity. Mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ .

**Table 1**

Comparison of  $^{31}\text{P}$  NMR and LC–TOF methods for the quantification of AMP, ADP and ATP levels in leaf samples (wild-type plants). See **Material and methods** for technical details. Mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Contents are given in  $\text{nmol g}^{-1}$  FW.

	LC–TOF	$^{31}\text{P}$ -NMR
Diluted samples		
AMP	3.3 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.6
ADP	14.3 $\pm$ 0.8	15.2 $\pm$ 1.1
ATP	27.3 $\pm$ 3.7	29.7 $\pm$ 0.6
Natural samples		
AMP	4.8 $\pm$ 0.7	3.4 $\pm$ 1.6
ADP	25.5 $\pm$ 0.8	24.3 $\pm$ 6.0
ATP	39.8 $\pm$ 9.1	40.8 $\pm$ 5.7
Av. ATP/ADP	1.7	1.8
Av. ATP/AMP	8.3	11.3

#### 4.2. Quinolate metabolism

The present study involves both the use of *nadc* plants and the addition of quinolate and therefore provide a tool to better understand quinolate metabolism. Quinolate may be converted to nicotinate-D-ribonucleotide (NaMN) by QPRT (EC 2.4.2.19) or decarboxylated to free nicotinate (Fig. 1). Quinolate decarboxylation has been shown to be significant at low pH or high temperature [26] and is believed to occur during pyrimidine degradation in mammals [27]. QPRT catalysis itself might undergo quinolate decarboxylation prior to phosphoribosyl-pyrophosphate transfer [28]. Therefore, nicotinate production from quinolate may have at least three simultaneous sources: spontaneous decarboxylation, QPRT-catalyzed decarboxylation and QPRT activity followed by NaMN hydrolysis by nicotinate phosphoribosyl transferase (EC 2.4.2.11) (Fig. 1). *In vivo*, quinolate addition caused a very large increase in leaf nicotinate content (Fig. 5). However, quinolate addition also caused a modest increase in nicotinamide and NAD, suggesting that nicotinamide production from NAD recycling (with NAD diphosphatase, EC 3.6.1.22, and nicotinamide mononucleotidase, EC 3.2.2.14, Fig. 1) occurred to some extent. Nicotinate may thus be further produced by nicotinamidase (EC 3.5.1.19) from nicotinamide.

The relative contribution of all these nicotinate sources remains uncertain. Typically,  $^{13}\text{C}$ - or  $^{14}\text{C}$ -labeling would be required to tackle quinolate metabolism in *Arabidopsis* leaves. In barley leaf tissue, labeling with  $^{14}\text{C}$ -quinolate and  $^{14}\text{C}$ -nicotinate lead to  $^{14}\text{C}$ -NAD at similar rates [29] suggesting that nicotinate phosphoribosyl transferase and QPRT activity contribute equally to NaMN synthesis. Here, we suggest that nicotinate phosphoribosyl transferase activity is readily reversible *in vivo* upon quinolate excess. Our data further suggest that QPRT is not a limiting step in NAD biosynthesis (or, in other words, has a very low control coefficient on NAD content), simply because the *nadc* line did not show a significant difference in NAD content before or after quinolate synthesis compared to the wild-type (Fig. 5). Furthermore, the increase in NaAD content remained very small. By contrast, the increase of the QPRT capacity was rather associated with a slightly larger quinolate degradation to nicotinate and nicotinamide. This further points to a significant role of nicotinate production and remobilization in NAD synthesis (reviewed in [15]).

#### 4.3. Metabolic effects of *nadc* expression

*Nadc* expression in *Arabidopsis* caused no significant increase in NAD content (Fig. 5) even in the presence of its precursor quinolate. Other limiting steps are certainly involved in NAD biosynthesis, such as the recycling of endogenous nicotinate by nicotinate phosphoribosyl transferase (see above). Quite surprisingly, the *nadc*

line showed subtle pleiotropic alterations in energetic metabolism, with a lower ATP content (Fig. 6), a lower ATP/ADP ratio (not shown), a slightly, insignificantly lower photochemical yield ( $F_v/F_m$ ) and photosynthesis (Fig. 6) and a lower NADP content (Fig. 5). This indicates a slight alteration of photosynthetic activity in *nadc* plants. The higher methylation status of THF further suggests the modification of photorespiratory metabolism in *nadc* plants. In fact, THF-based methylations are required for catalyzing glycine decarboxylation to serine (for a review, see [30]). This would agree with a subtle photorespiration/photosynthesis imbalance in *nadc* lines compared to the wild-type.

The origin of such an effect is uncertain, however. Enhancement in photorespiration has been observed in respiratory mutants that exhibit altered NAD contents [31], due to a lower leaf internal  $\text{CO}_2$  conductance [32]. Here, under ordinary  $\text{CO}_2$ -conditions ( $400 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ ), slightly different photosynthetic rates (wild-type  $8.4$ , *nadc*  $7.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Fig. 6) were obtained while intercellular  $\text{CO}_2$  mole fraction was nearly identical ( $321$  vs  $325 \mu\text{mol mol}^{-1}$ , respectively). It is thus plausible that internal conductance was  $\sim 8\%$  lower in *nadc* leaves, causing both internal  $\text{CO}_2$  mole fraction ( $c_c$ ) and the carboxylation-to-oxygenation ratio to be slightly smaller.

#### 4.4. Perspectives

Here, we have used a method for the simultaneous screening of up to 23 cofactors and nucleotide-related metabolites in *Arabidopsis* leaves. This method appeared to be accurate and useful for characterizing NAD biosynthetic metabolism. We recognize that this method is tedious due to cleanup treatments with solid-phase extraction. However, such a pre-purification is strictly required to increase the background-to-noise ratio associated with some metabolites. Our method may thus be applied to examine other metabolites that are co-purified with metabolites investigated here, such as phenolic derivatives or pyrimidine alkaloids (e.g. trigonelline). Furthermore, advantage may be taken from alterations of isotopic patterns after  $^{13}\text{C}$ -labeling. Typically, the addition of  $^{13}\text{C}$ -quinolate or  $^{13}\text{C}$ -nicotinate would allow one to trace  $^{13}\text{C}$ -fluxes into intermediates of NAD synthesis or to use isotopic dilution for high-precision quantification (for a specific discussion, see [33]).

#### Acknowledgements

The authors thank the *Institut Fédératif de Recherche 87* for its strong support to the Platform and the development of the quality management system. The technical support of *Bruker Daltonics* for operating LC–TOF analyses and maintenance is also acknowledged.

#### References

- [1] R.L. Last, A.D. Jones, Y. Shachar-Hill, Towards the plant metabolome and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 167–174.
- [2] J. Boccard, E. Grata, A. Thiocone, J.Y. Gauvrit, P. Lanteri, P.A. Carrupt, J.L. Wolfender, S. Rudaz, Multivariate data analysis of rapid LC-TOF/MS experiments from *Arabidopsis thaliana* stressed by wounding, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 86 (2007) 189–197.
- [3] S. Moco, R.J. Bino, O. Vorst, H.A. Verhoeven, J. de Groot, T.A. van Beek, J. Vervoort, C.H.R. de Vos, A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato, *Plant Physiol.* 141 (2006) 1205–1218.
- [4] R.C.H. de Vos, S. Moco, A. Lommen, J.J.B. Keurentjes, R.J. Bino, R.D. Hall, Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 778–791.
- [5] G. Piperopoulos, R. Lotz, A. Wixforth, T. Schmierer, K.P. Zeller, Determination of naphthodianthrones in plant extracts from *Hypericum perforatum* L. by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 695 (1997) 309–316.
- [6] J.V. Sancho, O.J. Pozo, T. Zamora, S. Grimalt, F. Hernandez, Direct determination of paclobutrazol residues in pear samples by liquid chromatography-

- electrospray tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 4202–4206.
- [7] M.B. Arnao, J. Hernandez-Ruiz, Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots, *J. Pineal Res.* 46 (2009) 295–299.
- [8] C. Crews, M. Driffield, F. Berthiller, R. Krska, Loss of pyrrolizidine alkaloids on decomposition of ragwort (*Senecio jacobaea*) as measured by LC-TOF-MS, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 3669–3673.
- [9] L. Gu, A.D. Jones, R.L. Last, Broad connections in the *Arabidopsis* seed metabolic network revealed by metabolite profiling of an amino acid catabolism mutant, *Plant J.* 61 (2010) 579–590.
- [10] S.D.S. Chiwocha, S.R. Abrams, S.J. Ambrose, A.J. Cutler, M. Loewen, A.R.S. Ross, A.R. Kermode, A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds, *Plant J.* 35 (2003) 405–417.
- [11] O. Novak, P. Tarkowski, D. Tarkowska, K. Dolezal, R. Lenobel, M. Strnad, Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single quadrupole mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 207–218.
- [12] S. Ek, H. Kartimo, S. Mattila, A. Tolonen, Characterization of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9834–9842.
- [13] V.V. Tolstikov, A. Lommen, K. Nakanishi, N. Tanaka, O. Fiehn, Monolithic silica-based capillary reversed phase liquid chromatography/electron spray mass spectrometry for plant metabolomics, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6737–6740.
- [14] A. Katoh, K. Uenohara, M. Akita, T. Hashimoto, Early steps in the biosynthesis of NAD in *Arabidopsis* start with aspartate and occur in the plastid, *Plant Physiol.* 141 (2006) 851–857.
- [15] G. Noctor, G. Quéval, B. Gakière, NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 1603–1620.
- [16] P. Pétriacoq, J. Hager, L. Didierlaurent, C. Mauve, F. Guérard, G. Noctor, S. Pelletier, J.P. Renou, G. Tcherkez, B. Gakière, Inducible NAD overproduction in *Arabidopsis* leads to metabolic and transcriptional alterations and increased salicylic acid mediated resistance to pathogens, *Plant J.*, in press.
- [17] S. Aubert, E. Gout, R. Bligny, R. Douce, Multiple effects of glycerol on plant metabolism, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 21420–21427.
- [18] R. Bligny, P. Gardeström, C. Roby, R. Douce, <sup>31</sup>P-NMR studies of spinach leaves and their chloroplasts, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 1319–1326.
- [19] S.E. Stein, An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10 (1999) 770–781.
- [20] P. Catz, W. Shinn, I.M. Kapetanovic, H. Kim, M. Kim, E.L. Jacobson, M.K. Jacobson, C.E. Green, Simultaneous determination of myristyl nicotinate, nicotinic acid, and nicotinamide in rabbit plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using methyl ethyl ketone as a deproteinization solvent, *J. Chromatogr. B* 829 (2005) 123–135.
- [21] D. Bullinger, R. Fux, G. Nicholson, S. Plontke, C. Belka, S. Laufer, C.H. Gleiter, B. Kammerer, Identification of urinary modified nucleosides and ribosylated metabolites in humans via combined ESI-FTICR MS and ESI-IT MS analysis, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 1500–1513.
- [22] B. Gambonet, S. Jabrin, S. Ravanel, M. Karan, R. Douce, F. Rébeillé, Folate distribution during higher plant development, *J. Sci. Food Agric.* 81 (2001) 835–841.
- [23] M. Stitt, R.M. Lilley, H.W. Heldt, Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts and mitochondria of wheat leaf protoplasts, *Plant Physiol.* 70 (1982) 971–977.
- [24] E.M. Thurman, I. Ferrer, A. Fernandez-Alba, LC-MS. I: basic principles and technical aspects of LC-MS for pesticide analysis, *Compr. Anal. Chem.* 53 (2005) 339–368.
- [25] R. Zhang, C.S. Sioma, R.A. Thompson, L. Xiong, F.E. Regnier, Controlling deuterium isotope effects in comparative proteomics, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3662–3669.
- [26] G.E. Dunn, G.K.J. Lee, H. Thimm, Kinetics and mechanism of decarboxylation of some pyridinecarboxylic acids in aqueous solution, *Can. J. Chem.* 50 (1972) 3017–3028.
- [27] K.D. Moudgil, B. Sadasivudu, Metabolism of proteins and non-protein nitrogenous compounds. in: G.P. Talwar, L.M. Srivastava (Eds.), *Biochemistry and Human Biology*. PHI Learning, New Dehli, 2004, pp. 409–411.
- [28] A. Rozenberg, J.K. Lee, Theoretical studies of the quinolinic acid to nicotinic acid mononucleotide transformation, *J. Org. Chem.* 73 (2008) 9314–9319.
- [29] I.J. Ryrie, K.J. Scott, Nicotinate, quinolinate and nicotinamide as precursors in the biosynthesis of nicotinamide-adenine dinucleotide in barley, *Biochem. J.* 115 (1969) 679–685.
- [30] A.D. Hanson, S. Roje, One-carbon metabolism in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (2001) 119–137.
- [31] C. Dutilleul, M. Garmier, G. Noctor, C. Mathieu, P. Chétrit, C.H. Foyer, R. De Paeppe, Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation, *Plant Cell* 15 (2003) 1212–1226.
- [32] P. Priault, G. Tcherkez, G. Cornic, R. De Paeppe, R. Naik, J. Ghashghaie, P. Streb, The lack of mitochondrial complex I in a CMSII mutant of *Nicotiana sylvestris* increases photorespiration through an increased internal resistance, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 3195–3207.
- [33] A.D. Hegeman, Plant metabolomics – meeting the analytical challenges of comprehensive metabolite analysis, *Brief. Funct. Genomics* 9 (2010) 139–148.

## Annexe 6

Djebbar, R., Rzigui, T., Pétriacq, P., Mauve, C., Priault, P., Fresneau, C., De Paepe, M., Florez-Sarasa, I., Benhassaine-Kesri, G., Streb, Gakère, B., Cornic, G., & De Paepe, R. (2011) Respiratory complex I deficiency induces drought tolerance by impacting leaf stomatal and hydraulic conductances. *Planta*, in press.

# Respiratory complex I deficiency induces drought tolerance by impacting leaf stomatal and hydraulic conductances

Reda Djebbar · Touhami Rzigui · Pierre Pétriacq · Caroline Mauve ·  
Pierrick Priault · Chantal Fresneau · Marianne De Paepe · Igor Florez-Sarasa ·  
Ghouziel Benhassaine-Kesri · Peter Streb · Bertrand Gakière · Gabriel Cornic ·  
Rosine De Paepe

Received: 13 May 2011 / Accepted: 18 September 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** To investigate the role of plant mitochondria in drought tolerance, the response to water deprivation was compared between *Nicotiana sylvestris* wild type (WT) plants and the CMSII respiratory complex I mutant, which has low-efficient respiration and photosynthesis, high levels of amino acids and pyridine nucleotides, and increased antioxidant capacity. We show that the delayed decrease in relative water content after water withholding in CMSII, as compared to WT leaves, is due to a lower stomatal conductance. The stomatal index and the abscisic acid (ABA) content were unaffected in well-watered mutant leaves, but the ABA/stomatal conductance relation was altered during drought, indicating that specific factors interact with ABA signalling. Leaf hydraulic conductance was lower in mutant leaves when compared to WT leaves and the role of

oxidative aquaporin gating in attaining a maximum stomatal conductance is discussed. In addition, differences in leaf metabolic status between the mutant and the WT might contribute to the low stomatal conductance, as reported for TCA cycle-deficient plants. After withholding watering, TCA cycle derived organic acids declined more in CMSII leaves than in the WT, and ATP content decreased only in the CMSII. Moreover, in contrast to the WT, total free amino acid levels declined whilst soluble protein content increased in CMSII leaves, suggesting an accelerated amino acid remobilisation. We propose that oxidative and metabolic disturbances resulting from remodelled respiration in the absence of Complex I activity could be involved in bringing about the lower stomatal and hydraulic conductances.

R. Djebbar and T. Rzigui participated equally to this work.

R. Djebbar  
Laboratoire de Physiologie et Biologie des Organismes, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, BP 39, El Alia, Bab Ezzouar, Algiers, Algeria

R. Djebbar · T. Rzigui · P. Priault · C. Fresneau · P. Streb ·  
G. Cornic (✉)  
Université Paris-Sud 11, Ecologie, Systématique et Evolution, UMR-CNRS 8079, Bâtiment 362, 91405 Orsay Cedex, France  
e-mail: gabriel.cornic@u-psud.fr

R. Djebbar · P. Pétriacq · M. De Paepe · B. Gakière ·  
R. De Paepe  
Université Paris-Sud 11, Institut de Biologie des Plantes, UMR-CNRS 8618, Bâtiment 630, 91405 Orsay Cedex, France

T. Rzigui  
Département de Biologie, Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétales, Faculté des Sciences de Tunis, 1060 Tunis, Tunisia

C. Mauve  
Université Paris-Sud 11 Plateforme Métabolisme Métabolome, IFR87 La Plante et son Environnement, Institut de Biologie des Plantes, Orsay, France

I. Florez-Sarasa  
Grup de Recerca en Biologia de les Plantes en Condicions Mediterrànies, Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears, 07122 Palma de Mallorca, Spain

G. Benhassaine-Kesri  
Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire UMR 7180 CNRS, Casier 156, Le Raphaël, 3 Rue Galilée, 94200 Ivry sur Seine, France

**Keywords** Drought · Mitochondria · *Nicotiana* · Pyridine nucleotides · Stomatal and hydraulic conductances · TCA cycle-derived metabolites

### Abbreviations

ABA	Abscissic acid
An	Net CO <sub>2</sub> assimilation by leaves
Ca, Ci, Cc, CO <sub>2</sub>	Molar ratios in the ambient atmosphere, the leaf intercellular air space and in the chloroplasts, respectively
CMS	Cytoplasmic male sterile
Gs	Stomatal conductance
GC–TOF-MS	Gas chromatography–time of flight-mass spectrometry
HPLC	High-performance liquid chromatography
KI	Leaf hydraulic conductance
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
RWC	Relative water content
ROS	Reactive oxygen species
RuBP	Ribulose 1,5- <i>bis</i> phosphate
WT	Wild type
Π0, ΠTLP, Π80	Leaf osmotic potential at water saturation, turgor lost pressure (TLP) and after 5 days at a leaf relative water content (RWC) of 80%

### Introduction

Drought is one of the major abiotic stresses limiting plant production worldwide. Water shortage is sensed by the roots that communicate information to the shoots and trigger a variety of strategies allowing tolerance and avoidance to the stress condition. Among them, avoiding water loss (by closing stomata) and maintaining water uptake (by increasing the proportion of dry matter allocated to root growth, by synthesizing compatible osmolytes as amino acids and sugars, Hare et al. 1998) despite drought are prominent. In addition, both protection and repair mechanisms induced at the cellular level contribute to homeostasis despite the changes occurring in the physical environment (Seki et al. 2007). Abscisic acid (ABA) is one of the major players in plant drought response, although ABA-independent pathways have been described (Desikan et al. 2004). ABA that is synthesized rapidly at the onset of drought induces stomatal closure, affects the root/leaf ratio and thus the plant water status (Wilkinson and Davies 2002). ABA interacts with many signalling pathways, triggering or modulating the expression of genes involved in a variety of responses to drought. For example, the

involvement of hydrogen peroxide and NO in the control of ABA accumulation and signalling has been known from a long time (reviewed in Kwak et al. 2006).

Besides its well-known effects on photosynthesis, effects of drought on mitochondrial activity have been widely documented and a possible involvement of mitochondria in drought adaptation has been proposed (reviewed in Atkin and Macherel 2009). Some mitochondrial proteins accumulate during drought and might participate to drought stress tolerance (Taylor et al. 2005). Mitochondria might contribute to the responses of plant cells to drought stress by functioning as redox sensors of oxidative stress and regulators of nuclear gene expression (Noctor et al. 2007a). Nevertheless, little information about the physiological and metabolic consequences of mitochondrial alterations on plant drought tolerance is currently available. The Arabidopsis *ndufs4* mutant, impaired in the assembly of phosphorylating complex I, was recently reported to be less affected by the arrest of watering than Col 0 (Meyer et al. 2009). The possible physiological and metabolic causes for this tolerance were not investigated, however the authors concluded that their results reflected differences in water uptake from the soil and/or delayed growth altering transpiration rate. A similar tolerance is expected in the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant lacking the NAD7 Complex I subunit (Gutierrez et al. 1997), since it has a lower stomatal conductance (gs) and thus a lower transpiration rate, compared to its WT counterpart (Sabar et al. 2000). Moreover, the CMSII mutation in *N. sylvestris* affects the interaction between chloroplasts and mitochondria (Dutilleul et al. 2003a; Priault et al. 2006a, b), the nitrogen/carbon balance in association with high levels of NAD, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and amino acids (Dutilleul et al. 2005) and enhances antioxidant activities and resistance to several biotic and abiotic stresses (Dutilleul et al. 2003b). Surprisingly, Gallé et al. (2010) did not notice any change in drought tolerance in comparison to the WT while studying the interactions between photosynthesis and respiration in the CMSII mutant submitted to water shortage. However, the rapid dehydration of the plants in this work did not allow measurements between a fully turgid state and a dehydrated state where CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O fluxes are very small. Therefore, a comprehensive view of the consequences of a mitochondrial defect on drought tolerance is currently lacking.

In the present study, we have examined how physiological and metabolic alterations of the CMSII mitochondrial mutant might affect early responses to drought stress. We show that the mutant maintains a higher water content during the drought period in relation with its low stomatal conductance. Whilst total leaf ABA content was not increased in the mutant, the low leaf hydraulic conductance might be critical in setting the maximum possible gs. We discuss how the altered metabolic adjustments associated with the



remodeled mitochondrial activity might be involved in the improved drought tolerance of the complex I mutant.

## Materials and methods

### Plant material and drought experiments

*Nicotiana sylvestris* L. wild-type (WT; obtained from Institut des Tabacs, Bergerac, France) and CMSII plants (obtained from WT cultures, Li et al. 1988) were greenhouse grown in 15 cm pots on a peat soil. Photoperiod was 16 h, day/night temperature 23.5/17.5°C and day/night relative humidity 60/50%. Daylight was supplemented by fluorescent lighting. Plants were irrigated with nutrient solution (Hydrokani C2Hydro Agri Spécialités, Nanterre, France). When the two lines had similar shoot and leaf sizes (about 2 and 3 months after sowing for WT and CMSII, respectively, due to the lower growth rate of the mutant), plants were used for drought experiments (Table 1; Fig. 1). Drought was imposed by withholding watering. Samples were taken from the fourth well-developed leaf at the times indicated. At least three plants were used for each time point. The experiment was carried out five times with similar results.

### Leaf RWC measurement

The weight of leaf discs (15 mm in diameter) was measured immediately after sampling (fresh weight, FW), after

**Table 1** Physiological properties of well-watered WT and CMSII plants used in drought experiments

Parameters	WT	CMSII
Leaf area (cm <sup>2</sup> )	437 ± 86.47 <sup>a</sup>	434.26 ± 77.7 <sup>a</sup>
Leaf dry weight (mg)	948.3 ± 83.2 <sup>a</sup>	986.4 ± 102.4 <sup>a</sup>
Leaf mass per area (mg cm <sup>-2</sup> )	2.17 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.32 <sup>a</sup>
Shoot/root ratio	4.41 ± 0.18 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.30 <sup>a</sup>
Stomatal index	0.23 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>a</sup>
Π <sub>0</sub> (MPa)	-0.87 ± 0.08 <sup>a</sup>	-0.99 ± 0.08 <sup>a</sup>
Π <sub>TLP</sub> (MPa)	-1.12 ± 0.06 <sup>a</sup>	-1.29 ± 0.13 <sup>a</sup>
RWC <sub>TLP</sub> (%)	0.77 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.03 <sup>a</sup>
Π <sub>80</sub> (MPa)	-1.08 ± 0.08 <sup>a</sup>	-0.92 ± 0.04 <sup>a</sup>
Kl (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> MPa <sup>-1</sup> )	29 ± 1 <sup>a</sup>	22.3 ± 1.3 <sup>b</sup>

*A<sub>n</sub>* net CO<sub>2</sub> assimilation by leaves, *R<sub>n</sub>* respiration in the dark, *g<sub>s</sub>* stomatal conductance for CO<sub>2</sub>, *Π<sub>0</sub>*, *Π<sub>TLP</sub>*, *Π<sub>80</sub>* leaf osmotic potential at water saturation, turgor lost pressure (TLP) and after 5 days at a leaf relative water content (RWC) of 80%, *Kl* leaf hydraulic conductance near saturation

Significant differences (*P* < 0.05) between WT and CMSII leaves are indicated by different letters



**Fig. 1** WT and CMSII plants after withholding watering for 6 days. In both genotypes, plants were at the rosette stage before bolting

24 h of immersion in deionized water at 4°C (saturation weight, SW), and after subsequent drying at 80°C for 48 h (dry weight, DW). RWC (%) was calculated as follows:  $RWC = 100 \times (FW - DW)/(SW - DW)$ .

### Gas exchange measurements

Gas exchange measurements were carried out on attached intact leaves using a Licor 6400 and a portable dew point generator, LI-610 (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). The console of the LI-6400 was fed with CO<sub>2</sub> free air through the LI-610 air humidificator that provides the desired water vapour pressure as described in Priault et al. (2006a). Leaf temperature was maintained at 25°C, photon flux density at 350 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, ambient CO<sub>2</sub> molar ratio (*C<sub>a</sub>*) at 380 ppm and leaf vapour pressure deficit at around 1 kPa. A relative value of CO<sub>2</sub> molar ratio in the chloroplast (*C<sub>c</sub>*) was estimated by measuring chlorophyll fluorescence as in Cornic and Briantais (1991). This allowed, first, to estimate the carboxylation (*J<sub>c</sub>*) and oxygenation (*J<sub>o</sub>*) rates of ribulose 1,5-bisphosphate according to Valentini et al. (1995) and second, to calculate the relative value of *C<sub>c</sub>* using the following equation:  $J_c/J_o = S(C_c/O)$ , assuming that drought did not change the specificity factor of Rubisco for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> (*S*) and the oxygen molar ratio in the chloroplasts (*O*).

### Determination of leaf hydraulic conductance and osmotic potential

Leaf hydraulic conductance of well-hydrated plants was estimated using the water potential relaxation technique modified for leaf discs by Nardini et al. (2008). Leaf water potential was measured on leaf discs using a dew point hygrometer (WP4-T, Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA). Well-watered plants were left overnight in a dark plastic bag to obtain high leaf water potential. A cut leaf was dehydrated to a water potential of about -0.3 MPa, then left in the dark in a tightly closed plastic

bag to stop transpiration and to allow water potential equilibration over the leaf blade. After being cut, a leaf disc (diameter of 3.6 cm) taken in the middle part of the leaf was immersed in water either 15 or 30 s in order to allow rehydration. Leaf discs covered nearly the entire surface of the sample holder of the dew point hygrometer. Pressure volume relations were according to Nardini et al. (2008). The same procedure was applied to dehydrated leaves except for the dehydration period before measurements. KI measurements were done on plants grown in the same conditions to those used for gas exchange measurements.

#### Stomatal index determination

Imprints from fully developed WT and CMSII leaves were made by coating the adaxial surface with clear nail varnish. After a few minutes, the varnish was gently peeled off the leaves and mounted onto slides to be examined with a light microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) coupled to a RT SPOT numeric camera (Diagnostic instrument, McHenry, IL, USA). The number of stomata and epidermal cells were then counted from three areas on each leaf to calculate the stomatal index (SI):  $S/(E + S)$ , where  $S$  is the number of stomata per unit area, and  $E$  is the number of epidermal cells per same unit area.

#### Determination of total ABA content

The ABA content of leaf samples was determined in aqueous extracts of freeze-dried tissue by a direct radio-immunoassay using an AFRC MAC252 monoclonal antibody, as described in Trouverie et al. (2004).

#### Pyridine nucleotide determination

Pyridine nucleotides were determined by plate-reader analyses according to Queval and Noctor (2007).

#### Metabolite determination

GC-TOF-MS and HPLC analyses were as described in Hager et al. (2010). In addition, free proline content was determined using the ninhydrin reaction (Magné and Larher 1992).

#### Determination of cellular ATP content

Leaf samples were immediately frozen and extracted in 1.5% TCA, centrifuged at 15,000g and a volume of the supernatant was diluted in 0.5 M Tris-acetate pH 7.75 (1:300, v/v). Determination of ATP content was made using the Enliten ATP assay (Promega Corp., Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions.

#### Statistical analyses

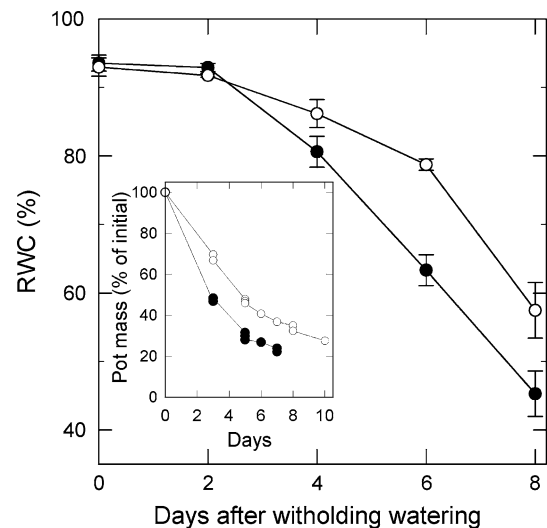
All experiments were repeated independently at least three times. The significance of differences was determined using Student's test at the  $P < 0.05$  level.

## Results

Changes in leaf water content, stomatal and hydraulic conductances, and photosynthetic parameters during drought

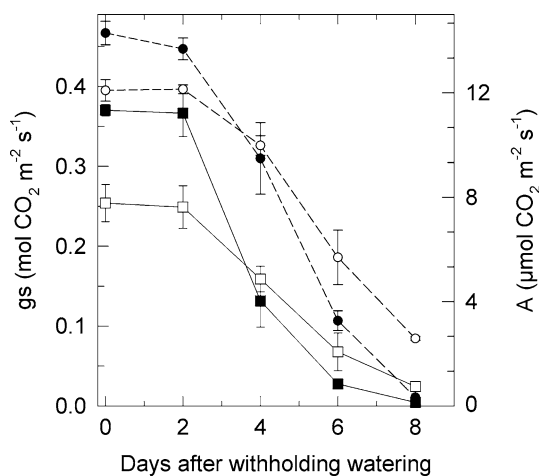
Although mutant plants grew more slowly than WT plants, they eventually achieved a similar shoot biomass (Dutilleul et al. 2003a; Fig. 1) and therefore it was possible to apply the dehydration treatment to the two lines at a similar developmental stage. At the onset of the drought, WT and CMSII well-watered plants (RWC 92–94%) had indeed the same foliar evaporative surfaces, total dry weight, leaf mass per area (LMA) and shoot/root ratios (Table 1). Nevertheless, after withholding watering, CMSII maintained a higher leaf RWC than WT plants (Fig. 2). After 6 days of drought, when RWC was 63 and 79% in WT and CMSII leaves, respectively, only WT leaves were wilted (Fig. 1) as expected from the values of RWC at turgor lost pressure (RWC<sub>TLP</sub>) (Table 1). Accordingly, the loss of water from the CMSII containing soil was initially slower (inset Fig. 2).

At the onset of drought, stomatal conductance for CO<sub>2</sub> (gs) and net CO<sub>2</sub> uptake by leaves (An) were also lower in the CMSII mutant (Fig. 3), as previously reported (Sabar



**Fig. 2** Leaf relative water content (RWC) as a function of time after withholding watering. WT (closed circle), CMSII (open circle). Data are mean  $\pm$  SE of four independent measurements. The inset shows the relative variation of the soil + pot mass during the drought period





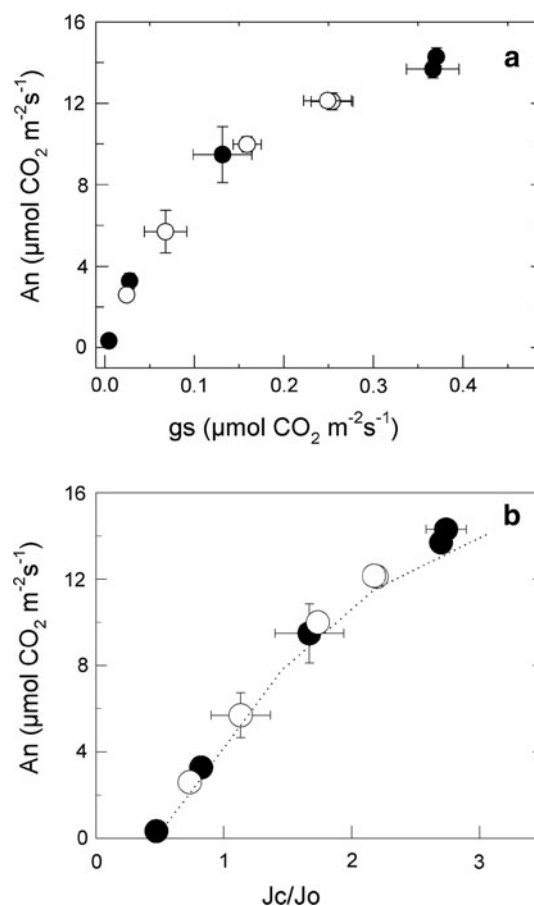
**Fig. 3** Stomatal conductance (*gs* closed and open squares) and net CO<sub>2</sub> uptake (*An* closed and open circles) as a function of time after withholding watering. *Closed symbols* WT, *open symbols* CMSII. Conditions: leaf temperature 25°C, vapour pressure deficit (VPD) 1 ± 0.2 kPa, photon flux density (PFD) 350 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Data are mean ± SE of four independent measurements

et al. 2000; Dutilleul et al. 2003a; Priault et al. 2006a, b, 2007). Low *gs* in CMSII leaves was not due to a modified stomatal density (Table 1). Moreover, leaf hydraulic conductance (*Kl*) was higher in WT plants, while there were no significant differences in osmotic potential at leaf water saturation ( $\Pi_0$ ) and osmotic potential and RWC at the turgor lost point ( $\Pi_{TLP}$  and  $RWC_{TLP}$ , respectively; Table 1).

Withholding watering caused a slower decrease of *gs* (Fig. 3) in CMSII leaves. As a result, *gs* was higher in the mutant than in the WT after day 4. The trend followed by *An* during drought treatment (Fig. 3) was similar and the relation between *An* and *gs* was the same for WT and CMSII leaves (Fig. 4a). However, both *gs* and *An* were lower in CMSII between 94 and 60% RWC (Fig. 5a, c). While *Kl* of the WT plants showed a large decrease between 94 and to 66% RWC, *Kl* of the mutant remained constant within this range (Fig. 5b). The relationship between *An* and *Jc/Jo* (a relative estimation of CO<sub>2</sub> molar ratio in the chloroplast) during the experiments was also the same for WT and CMSII leaves and identical to that observed with non-dehydrated leaves of both genotypes when the ambient CO<sub>2</sub> molar ratio was changed from about 380 to 50 ppm (Fig. 4b).

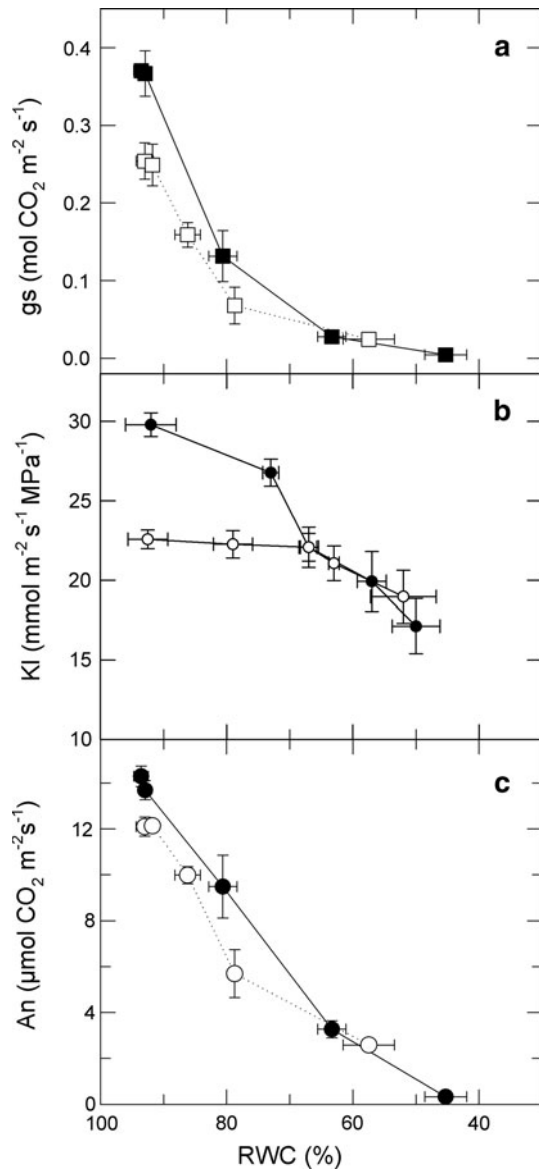
ABA concentration changes

Despite the lower leaf conductance in CMSII, total leaf ABA levels were similar in both well-watered WT and mutant plants (Fig. 6a). ABA increased in both genotypes at day 4 of the drought to reach the same value (about 6 ng mg<sup>-1</sup> DW) at day 8, before decreasing. At day 4, leaf



**Fig. 4** **a** Relation between *An* and *gs* during the drought. Abbreviations and conditions are the same as in Fig. 3. **b** Relation between *An* and *Jc/Jo* during drought. *Jc* RuBP carboxylation, *Jo* RuBP oxygenation. *Closed symbols* WT, *open symbols* CMSII. Data are calculated from the results of Fig. 3 and concomitant measurements of chlorophyll fluorescence emission (see “Materials and methods”). The *Jc/Jo* ratio is proportional to the CO<sub>2</sub> molar ratio in the chloroplasts. The relation shown by the short dashed line is the same relation obtained by changing the ambient CO<sub>2</sub> from 380 to 50 ppm around well-watered WT and CMSII intact leaves. Conditions, see the legend of Fig. 3

ABA content was about 2 ng mg<sup>-1</sup> DW in CMSII leaves, while it was 4 ng mg<sup>-1</sup> DW in the WT, showing that the ABA increase was initially slower in CMSII when compared to WT plants. This faster increase of ABA content in the WT (Fig. 6a) was presumably due to an early root signal triggered by a more rapid soil desiccation in the first days of drought (inset Fig. 2; Wilkinson and Davies 2002). However, leaf ABA content was higher in CMSII for RWCs around 80% (Fig. 6b). Nevertheless the capacity for ABA synthesis and/or accumulation was probably the same in both genotypes as indicated by the same amount of ABA measured in the leaves at day 8 after withholding water. In contrast to what was observed in WT, *gs* was not linearly correlated to leaf ABA content in CMSII (Fig. 6c). The

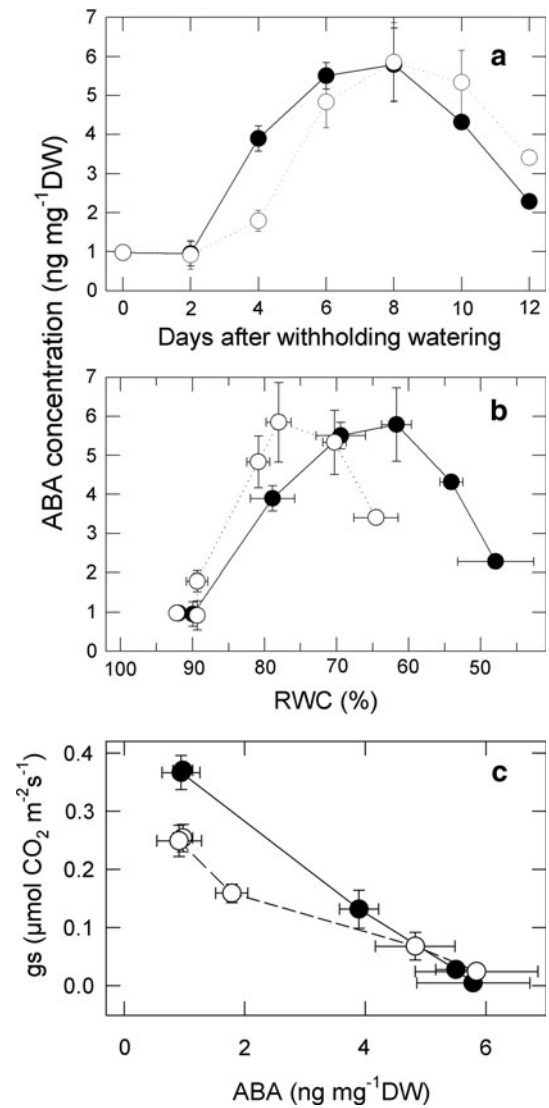


**Fig. 5** Stomatal conductance, hydraulic conductance and  $\text{CO}_2$  uptake as a function of RWC. **a**  $gs$ , **b**  $KI$ , **c**  $An$ . Abbreviations and conditions are the same as in Fig. 3. *Closed symbols* WT, *open symbols* CMSII

stomata response to ABA was obviously different in the two genotypes.

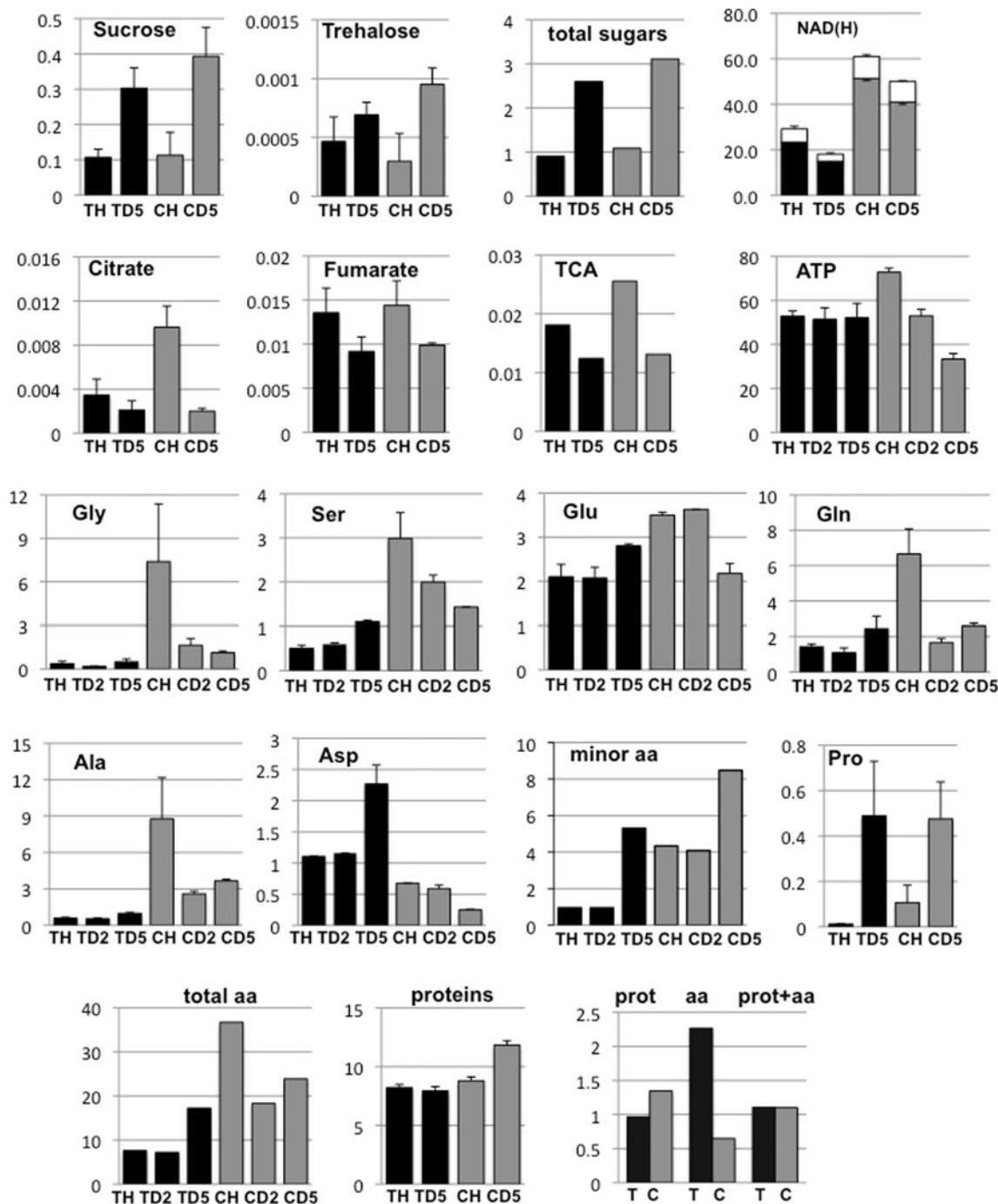
Changes in the content of leaf mitochondrial-derived metabolites during drought

The Complex I mutation has been shown to impact on the content of various mitochondrial-derived metabolites in well-watered CMSII leaves compared to the WT, including increased levels of NADH, TCA cycle intermediates, amino acids and ATP, whereas sugar contents were less affected (Dutilleul et al. 2005; Szal et al. 2008; Hager et al. 2010, and this work). We compared changes in the levels



**Fig. 6** Leaf ABA concentrations after water was withheld as a function of time (**a**) and as a function of RWC (**b**). **c** Relation between  $gs$  and ABA concentration. *Closed symbols* WT, *open symbols* CMSII. Data are from an experiment carried out in parallel with the experiment described in Fig. 3. Data are mean  $\pm$  SE of at least three independent measurements; WT and CMSII values are significantly different at the 4-day time point;  $gs$  data are from Fig. 3

of these metabolites in WT and CMSII leaves on a fresh weight basis after the arrest of watering. GC-MS-TOF analyses showed a rapid increase in soluble sugar contents in both genotypes, in particular sucrose (Fig. 7) and fructose (data not shown). Total sugar content increased by more than twofold in the WT and by threefold in the mutant after day 5 of withholding water (Fig. 7). Moreover, a significant increase in trehalose, a low-abundance sugar reported to participate to drought tolerance in several species (Garg et al. 2002), was observed in CMSII only (Fig. 7). In contrast, TCA cycle derived organic acids (with the exception of malate, the most abundant organic acid in



**Fig. 7** Changes in metabolite content during drought. *Black bars* WT (T), *grey bars* CMSII (C). Well-hydrated plants, H; 2 days (D2) and 5 days (D5) after withholding watering to greenhouse-grown plants. Leaf NAD(H) levels were determined as in Queval and Noctor (2007) and expressed in  $\text{nmoles g}^{-2}$ . *White bars* reduced forms. Data are mean  $\pm$  SE of samples from at least three different plants. Total leaf ATP content was determined by the ENLITEN ATP assay (Promega) and expressed in  $\text{nmoles g}^{-2}$ . Data are mean  $\pm$  SE of at least five measurements on different plants. Amino acids (excluding Pro) were determined by HPLC as described in Hager et al. (2010) and expressed in  $\mu\text{moles g}^{-2}$ . Data are mean  $\pm$  SE of two different plants from the same experiment, and three independent experiments gave

similar results. Minor amino acids include  $\gamma$ -ABA, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp and Val. Proline, TCA cycle intermediates (citrate, isocitrate, succinate, fumarate) and soluble sugars (glucose, sucrose, fructose) were determined by GC-TOF-MS as described in Hager et al. (2010). Protein content was determined according to Lowry and expressed in  $\text{g m}^{-2}$ . Data are mean  $\pm$  SE of measurements from at least three independent plants. In the last graph (*bottom right*), histograms are ratios of values of drought-stressed plants (D5, 5 days after arrest of watering) to well-hydrated plants (H); prot + aa, sum of proteins and amino acids during drought; mass of amino acids was calculated assuming an average molecular weight of 130

both WT and CMSII leaves) decreased in both genotypes (Fig. 7). Citrate levels were the most affected by the drought treatment, decreasing by about 50% in the WT and about 80% in CMSII plants. NAD(H) levels also decreased during the first days of drought in both genotypes, but less extensively in the mutant. In contrast, total leaf ATP content markedly decreased in CMSII while it remained constant in the WT. Note that ATP content was higher in the mutant than in the WT before watering was withheld and lower after 5 days of water stress (Fig. 7). Moreover, while withholding watering did not induce marked changes in WT leaf major amino acids (Ala, Gly, Ser, Glu, Gln), their content markedly decreased in CMSII leaves (Fig. 7). Aspartate, the only amino acid to show a lower content in CMSII than in WT well-hydrated leaves, increased in the WT, and decreased in the mutant. However, the sum of minor amino acids derived from aspartate (Lys, Thr, Met, Ileu, Asn), pyruvate (Leu, Val), phospho-enol pyruvate (Trp, Phe) and glutamate (Pro) was significantly increased at day 5 in both genotypes. The increase in Pro, as estimated from GC-TOF-MS analyses, was particularly important, and its absolute content determined using the ninhydrin reaction (Magné and Larher 1992) was found to increase from 3–7 to 25 nmol/cm<sup>2</sup> at day 5.

Globally, amino acid content increased by twofold in the WT and decreased by 40% in CMSII leaves. In contrast, soluble protein content increased in the mutant, whereas it remained nearly constant in the WT (Fig. 7). The CMSII/WT protein ratio, that was 1 in well-watered leaves, was about 1.5 in drought-stressed leaves.

## Discussion

Water loss is delayed in CMSII leaves due to their lower stomatal conductance (*g<sub>s</sub>*) at the onset of the drought treatment

The delayed water loss in CMSII was neither the result of a smaller transpiring leaf surface nor due to a higher mass of absorbing roots since the shoot/root ratio and total leaf surface of the plants at the beginning of the experiment were similar in both genotypes (Table 1). Furthermore, the CMSII mutation did not lead to changes in (i) osmotic potential at leaf saturation ( $\Pi_0$ ) and at leaf turgor lost pressure (TLP;  $\Pi_{TLP}$ ), (ii) RWC<sub>TLP</sub> and stomatal density. Moreover, the osmotic potential of attached leaves maintained at a 80% RWC during 8–12 days was the same in both genotypes and identical to that obtained when dehydrating rapidly turgid leaves to a RWC of 80% (T. Rzigui, unpublished data); *N. sylvestris* plants did not show osmotic adjustment during a drought as previously observed for the related species *N. tabacum* (Karakas et al. 1997).

The drought tolerance of CMSII, compared to WT plants, was most likely the consequence of the lower stomatal conductance (*g<sub>s</sub>*) under well-hydrated conditions and during the first days of the drought period (Fig. 3), and not to a better water absorption efficiency, since soil water content remained higher after watering was withheld (inset Fig. 2). From 4 days after withholding watering, *g<sub>s</sub>* was higher in CMSII compared to WT leaves. Accordingly, CO<sub>2</sub> assimilation (*A<sub>n</sub>*) was also higher from day 4 in CMSII (Fig. 3). However, no more differences between genotypes could be detected under severe drought stress, when *g<sub>s</sub>* dropped below about 0.05 mol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, as previously reported by Gallé et al. (2010) in conditions of very rapid dehydration. Moreover, recovery of photosynthetic activity after rewatering occurred in less than 2 days and was the same in both genotypes (own unpublished results), as previously reported by Gallé et al. (2010).

It is obvious that the higher levels of stomatal conductance and CO<sub>2</sub> assimilation after 4 days without watering in CMSII leaves was related to their capacity to maintain their water content and not to a differential response to a lack of water: (i) *g<sub>s</sub>* and *A<sub>n</sub>* were lower in CMSII than in WT (Fig. 5a, c) within the range 92–60% RWC and (ii) similarly affected by drought as indicated by identical relations between *A<sub>n</sub>* and *g<sub>s</sub>* (Fig. 4a), and between *A<sub>n</sub>* and the relative measurement of the CO<sub>2</sub> molar ratio in the chloroplasts, *C<sub>c</sub>* (Fig. 4b) in CMSII and WT. Thus, when compared to WT, the CMSII mutant was able to maintain a higher photosynthetic activity during the first days of external water limiting conditions. Indeed, CMSII plants maintained 7–12 days at a leaf RWC of about 80% showed a higher *A<sub>n</sub>* (by 15%) than WT plants in the same conditions (T.R. unpublished results).

Interestingly, the hydraulic conductance (*K<sub>I</sub>*) of the mutant did not change until the RWC reached less than 66% while that of the WT showed a substantial decline throughout the same range of RWCs. Thus, in contrast to the WT, CMSII was able to maintain a mesophyll cell water status within the RWC range that occurred in non-stressed conditions by both limiting transpiration and maintaining water absorption capacity.

The lower stomatal conductance in well-watered CMSII plants is best explained by a lower hydraulic conductance and not by a higher ABA content of the leaf

As ABA is a key control element of stomatal aperture (Verslues and Bray 2006), the lower stomatal conductance of CMSII well-watered leaves was expected to be associated with increased ABA levels when compared with WT leaves. However, in agreement with previous results (Pellny et al. 2008), there was no difference in leaf ABA

content in CMSII and WT leaves, suggesting that the lower stomatal conductance was mediated by ABA-independent processes in the mutant. In fact, ABA interacts with so many processes, outside and inside the guard cell, that it is difficult to assess its importance by just measuring total leaf ABA content (Wilkinson and Davies 2002; Kwak et al. 2006), and a differential ABA accumulation in CMSII guard cells cannot be excluded. Moreover, it is interesting to note that during drought, the correlation between stomatal conductance and ABA content was not linear in CMSII leaves, suggesting that specific factors might interact with ABA signalling in the mutant.

In contrast to ABA, leaf hydraulic conductance (KI) was altered in CMSII plants, and it could be that a low KI was critical in setting the maximum possible *g<sub>s</sub>*. Indeed, it has been shown from different tropical and temperate angiosperms and temperate conifer species that KI is strongly related to *g<sub>s</sub>*, indicating that there is an internal leaf-level regulation of liquid and vapour conductances (Brodribb et al. 2005). It is remarkable that the *g<sub>s</sub>* and KI values obtained from both well-watered CMSII and WT leaves could be adjusted to the regression line between *g<sub>s</sub>* and KI of Brodribb et al. (2005). The major hydraulic resistance of the leaves (up to 80%) would reside in the non-vascular systems, both symplasmic and apoplastic (cell wall) (Cochard et al. 2004). Moreover, Cochard et al. (2007) provided some evidence that KI is regulated by the activity of leaf aquaporins, showing the importance of the symplasmic route of water flow. Thus, as ROS have been reported to be involved in aquaporin gating (Kim and Steudle 2009), it can be speculated that ROS dependent down-regulation of aquaporin activities might be responsible for the lower KI observed in CMSII leaves. Indeed, there are several indications that, as in other plant Complex I mutants (Meyer et al. 2009), ROS might accumulate in some cell or subcellular compartments in the tobacco mutant. Nitroblue tetrazolium (NBT) staining, which is generally considered to be indicative of superoxide accumulation (although non-specific), was more accentuated in CMSII than in WT veins (Dutilleul et al. 2003b). Despite the lack of Complex I, CMSII mitochondria might produce higher amounts of ROS via activation of Complex III (Priault et al. 2007), the main source of superoxide in the plant respiratory chain (Møller 2001). ROS accumulation outside the mitochondria in the mutant has been suggested by the over-expression of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive genes such as *AOX*, cytoplasmic *cAPX* and mitochondrial *MnSOD* and increased related activities (Sabar et al. 2000; Dutilleul et al. 2003b; discussed in Priault et al. 2007). Activation of the antioxidant system is likely to be involved in the observed enhanced tolerance of the mutant to ozone, tobacco mosaic virus (Dutilleul et al. 2003b) and methyl

viologen (P. Pétriacq, unpublished results). Thus, an elevated ROS content of well-watered CMSII leaves might modulate stomatal closure by both ABA signalling and aquaporin gating.

#### Possible metabolic clues to the low stomatal and hydraulic conductances of Complex I mutant leaves

In addition to ROS-dependent changes in aquaporin activity and ABA signalling discussed before, metabolic changes associated to the CMSII mitochondrial mutation might also be involved in the decreased stomatal conductance of the mutant. Indeed, besides its well-known role in ATP and ROS production, mitochondria are involved in nitrogen metabolism, by providing carbon skeletons and ammonium for amino acid synthesis (Hanning and Heldt 1993), and various mitochondria-derived metabolites have been reported to interfere with stomatal opening (Nunes-Nesi et al. 2011). Considering the data of Fig. 7 for the well-watered plants, a number of correlations can be made concerning already published results: (i) nitrogen content (ammonium, amino acids), that is higher in CMSII well-watered leaves (Dutilleul et al. 2003a, b, 2005), has been reported to interfere with stomatal opening and drought responses in tobacco and other species (Guo et al. 2003; Lu et al. 2005); (ii) studies of transgenic tomato plants modified for different TCA cycle enzymatic activities, such as fumarase and malate dehydrogenase, suggest that mitochondria trigger stomatal movements by controlling organic acid levels (that are higher in CMSII) in both the vacuole and the apoplast (Nunes-Nesi et al. 2007, discussed in Nunes-Nesi et al. 2011); (iii) there are higher levels of NAD(H) and ATP in well-hydrated CMSII as seen in *Arabidopsis* (poly)ADP-ribose polymerase (PARP) mutants, which maintain a higher water content when watering is withheld (De Block et al. 2005), however, stomatal conductance was not determined in this study; (iv) more generally, due to its signalling roles and importance for redox homeostasis (Noctor et al. 2007b; Hashida et al. 2010), NADH can interfere with stomatal aperture through a control of ABA effects (Vanderauwera et al. 2007), aquaporin gating (Kim and Steudle 2009), or other regulations, including TCA cycle enzymes themselves (Falk et al. 1998). Therefore, the high content of various mitochondria-derived metabolites might affect stomatal behaviour in CMSII well-watered leaves, although it is clear that given the number of respiratory and TCA cycle bypasses in plants, more than one mechanism might be involved.

After the arrest of watering, changes in metabolite content were very early responses in both genotypes, occurring before RWC and stomatal conductance were markedly affected, especially in CMSII. Some of the



changes, such as increased sugars and decreased NAD(H) were similar in WT and CMSII, although with quantitative differences (Fig. 7). Note that the positive correlation between NAD(H) and amino acid content observed in well-watered WT and CMSII plants under different environmental conditions (Hager et al. 2010) was lost in drought-stressed plants. Indeed, total free amino acid levels increased in the WT, as often reported in other drought-stressed plants (Barnett and Naylor 1966; Good and Zaplachinski 1994; Charlton et al. 2008), but decreased in CMSII (Fig. 7). Such results suggest that the source of carbon skeletons provided by the TCA cycle might be more rapidly depleted in CMSII than in the WT, in good agreement with the higher decrease in organic acid levels (Fig. 7). This could result from both a lower input (lower assimilation rates, Fig. 3) and a higher output (higher respiration rates), during the first days of drought, as reported in Gallé et al. (2010) and our unpublished data. Alternatively, the shift in amino acid levels in CMSII leaves could result from a more active incorporation into proteins. Indeed, the sum of the mass of proteins and of amino acids showed little changes during the first days after withholding watering in both genotypes. This strongly suggests a more extensive amino acid remobilisation in the mutant that might be consistent with ATP depletion when watering is stopped. This could be caused by redox regulations as elevated ROS and glutathione levels (Vidal et al. 2007). Whether amino acid remobilisation in CMSII concerns proteins important for drought adaptation remains to be determined, but it should be noted that, despite increased general proteolysis, specific proteins, including mitochondrial proteins, have been shown to be synthesised during drought and proposed to be involved in acclimation of pea and *A. thaliana* to stress (Taylor et al. 2005; Hummel et al. 2010). Moreover, it is interesting to note that despite the drought-induced shift in total free amino acids in CMSII, minor amino acids involved in stress responses such as Pro accumulated in both genotypes (Fig. 7). The protective role of Pro in protein stabilisation and osmotic adjustment has been known for a long time (for a recent review, see Szabados and Saviouré 2009). Although we did not observe any osmotic adjustment when measuring bulk leaf water potential, we cannot exclude that it does not exist in specific cellular compartments or cells within the leaf. Whatever the complex network of metabolic changes induced by the arrest of watering and their possible role in water stress tolerance, it is interesting to note that most of the differences observed between well-watered leaves of the two genotypes were strongly attenuated after 5 days of water stress (Fig. 7). This is similar for stomatal conductance (Fig. 4), further highlighting probable interactions between mitochondria-derived metabolites and stomatal conductance.

## Conclusion

Previous studies concerning the CMSII mutant lacking respiratory Complex I activity have revealed an effective antioxidant cross-talk between mitochondria and other organelles that has been correlated to an improved resistance to oxidative stress due to ozone and TMV infection (Dutilleul et al. 2003b). Results presented here show that the lack of respiratory Complex I also leads to lower stomatal and hydraulic conductances and a better tolerance to water deprivation. These physiological changes are likely to be mediated by the interaction of oxidative and metabolic disturbances resulting from the remodelled respiration. Interaction between photosynthetic performance (changes in net CO<sub>2</sub> uptake and stomatal conductance) and leaf mitochondrial activities have been studied especially in transgenic plants inhibited in TCA cycle enzymatic activities (reviewed by Nunes-Nesi et al. 2011). Some metabolic and physiological properties of the Complex I mutant are reminiscent of those observed in tomato plants deficient in fumarase activity, such as stomatal closure and lower CO<sub>2</sub> assimilation in the light. However, remarkable differences in mitochondrial electron transport chain functioning exist between the TCA cycle and CMSII mutants, since CMSII mitochondria exhibit increased respiration rates in the dark and in the light. Thus, the *N. sylvestris* Complex I mutant presents an original aspect of the interactions between mitochondria, chloroplasts, and stomata that result in drought tolerance.

**Acknowledgments** This work was supported by the University Paris-Sud 11, the Centre National de la Recherche Scientifique, the French Ministry of Research, and the Algerian and Tunisian Ministries of Research. IF-S was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grant BFU2008-01072/BFI). We wish to thank Drs. Michael Hodges and Guillaume Tcherkez (Institut de Biologie des Plantes, UMR CNRS 8618, Université Paris-Sud 11, Orsay, France) for carefully reading the manuscript and Roland Boyer (University Paris-Sud 11) for the photographic artwork. The constructive comments of two anonymous referees are gratefully acknowledged.

## References

- Atkin OK, Macherel D (2009) The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Ann Bot* 103:581–597
- Barnett NM, Naylor AW (1966) Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiol* 41:1222–1230
- Brodribb TJ, Holbrook NM, Zwieniecki MA, Palma B (2005) Leaf hydraulic capacity in ferns, conifers and angiosperms: impacts on photosynthetic maxima. *New Phytol* 165:839–846
- Charlton AJ, Donarski JA, Harrison M, Jones SA, Godward J, Oehlschlager S, Arques JL, Ambrose M, Chinoy C, Mullineaux PM, Domoney C (2008) Responses of the pea (*Pisum sativum* L.) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics* 4:312–327

- Cochard H, Nardini H, Coll L (2004) Hydraulic architecture of leaf blades: where is the main resistance? *Plant Cell Environ* 27:1257–1267
- Cochard H, Venisse J-S, Barigah TS, Brunel N, Herbette S, Guillot A, Tyree MT, Sakr S (2007) Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiol* 143:122–133
- Cornic G, Briantais J-M (1991) Partitioning of photosynthetic electron flow between CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> reduction in a C<sub>3</sub> leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO<sub>2</sub> concentrations and during drought stress. *Planta* 183:178–184
- De Block M, Verduyn C, De Brouwer D, Cornelissen M (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance. *Plant J* 41:95–106
- Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot* 55:205–212
- Duttilleul C, Driscoll S, Cornic G, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G (2003a) Tobacco leaves require functional mitochondrial complex I for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiol* 313:264–275
- Duttilleul C, Garmier M, 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
- Duttilleul C, Lelarge C, Prioul JL, De Paepe R, Foyer CH, 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
- Falk K, Behal RH, Xiang C, Oliver DJ (1998) Metabolic bypass of the tricarboxylic acid cycle during lipid mobilization in germinating oilseeds. Regulation of NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase versus fumarase. *Plant Physiol* 117:473–481
- Gallé A, Florez-Sarasa I, Thameur A, De Paepe R, Flexas J, Ribas-Carbo M (2010) Effects of drought stress and subsequent rewetting on photosynthetic and respiratory pathways in *Nicotiana sylvestris* wild type and the mitochondrial complex I-deficient CMSII mutant. *J Exp Bot* 61:765–775
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15898–15903
- Good AG, Zaplachinski ST (1994) The effects of drought stress on free amino acids accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. *Physiol Plant* 90:9–14
- Guo FQ, Young J, Crawford NM (2003) The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in Arabidopsis. *Plant Cell* 15:107–117
- 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 alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3436–3441
- Hager J, Pellny TK, Mauve C, Lelarge-Trouverie C, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G (2010) Conditional modulation of NAD levels and metabolite profiles in *Nicotiana sylvestris* by mitochondrial electron transport and carbon/nitrogen supply. *Planta* 231:1145–1157
- Hanning I, Heldt HW (1993) On the function of mitochondrial metabolism during photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. Partitioning between respiration and export of redox equivalents and precursors for nitrate assimilation products. *Plant Physiol* 103:1147–1154
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation in plants. *Plant Cell Environ* 21:535–553
- Hashida SN, Itami T, Takahashi H, Takahara K, Nagano M, Kawai-Yamada M, Shoji K, Goto F, Yoshihara T, Uchimiya H (2010) Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in Arabidopsis. *J Exp Bot* 61:3813–3825
- Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteillé M, Stitt M, Gibon Y, Muller B (2010) Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol* 154:357–372
- Karakas B, Ozias-Akins P, Stushnoff C, Suefferheld M, Rieger M (1997) Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ* 20:609–616
- Kim YX, Steudle M (2009) Gating of aquaporins by light and reactive oxygen species in leaf parenchyma cells of the midrib of *Zea mays*. *J Exp Bot* 60:547–556
- Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI (2006) Update on reactive oxygen species in hormone responses: the role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol* 141:323–329
- Li XQ, Chétrit P, Mathieu C, Vedel F, De Paepe R, Rémy R, Ambard-Bretteville F (1988) Regeneration of cytoplasmic male sterile protoclones of *Nicotiana sylvestris* with mitochondrial variations. *Curr Genet* 13:261–266
- Lu YX, Li CJ, Zhang FS (2005) Transpiration, potassium uptake and flow in tobacco as affected by nitrogen forms and nutrient levels. *Ann Bot* 95:991–998
- Magné C, Larher F (1992) High sugar content of extracts interferences with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Anal Biochem* 200:115–118
- Meyer EH, Tomaz T, Carroll AJ, Estavillo G, Delannoy E, Tanz SK, Small ID, Pogson BJ, Millar AH (2009) Remodeled respiration in *ndufs4* with low phosphorylation efficiency suppresses Arabidopsis germination and growth and alters control of metabolism at night. *Plant Physiol* 151:603–619
- Møller IM (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
- Nardini A, Gortan E, Ramani M, Salleo S (2008) Heterogeneity of gas exchange rates over the leaf surface in tobacco: an effect of hydraulic architecture? *Plant Cell Environ* 31:804–812
- Noctor G, De Paepe R, Foyer CH (2007a) Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci* 12:125–134
- Noctor G, Quéval G, Gakière B (2007b) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J Exp Bot* 57:1603–1620
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J* 50:1093–1106
- Nunes-Nesi A, Araújo WL, Fernie AR (2011) Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. *Plant Physiol* 155:101–107
- Pellny TK, Van Aken O, Duttilleul C, Wolff T, Groten K, Bor M, De Paepe R, Reyss A, Van Breusegem F, Noctor G, Foyer CH (2008) Mitochondrial respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogen-dependent regulation of plant architecture in *Nicotiana sylvestris*. *Plant J* 54:976–992
- Priault P, Fresneau C, Noctor G, De Paepe R, Cornic G, Streb P (2006a) The mitochondrial CMSII mutation of *Nicotiana sylvestris* impairs adjustment of photosynthetic carbon assimilation to higher growth irradiance. *J Exp Bot* 57:2075–2085

- Priault P, Tcherkez G, Cornic G, De Paepe R, Naik R, Ghashghaie J, Streb P (2006b) The lack of mitochondrial complex I in a CMSII mutant of *Nicotiana sylvestris* increases photorespiration through an increased internal resistance to CO<sub>2</sub> diffusion. *J Exp Bot* 57:3195–3207
- Priault P, Vidal G, De Paepe R, Ribas-Carbo M (2007) Leaf age-related changes in respiratory pathways are dependent on complex I activity in *Nicotiana sylvestris*. *Physiol Plant* 129:152–162
- Queval G, Noctor G (2007) A plate-reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione and ascorbate in tissue extracts: application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal Biochem* 363:58–69
- Sabar M, De Paepe R, de Kouchkovsky Y (2000) Complex I impairment, respiratory compensations and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol* 124:1239–1250
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 10:296–302
- Szabados L, Savouré A (2009) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15:89–97
- Szal B, Dabrowska Z, Malmberg G, Gardeström P, Rychter AM (2008) Changes in energy status of leaf cells as a consequence of mitochondrial genome rearrangement. *Planta* 227:697–706
- Taylor NL, Heazlewood JL, Day DA, Millar AH (2005) Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Mol Cell Proteomics* 4:1122–1133
- Trouverie J, Chateau-Joubert S, Thevenot C, Jacquemot MP, Prioul JL (2004) Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. *Planta* 219:894–905
- Valentini R, Epron D, De Angelis P, Matteucci G, Dreyer E (1995) *In situ* estimation of net CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell Environ* 18:631–640
- Vanderauwera S, De Block M, Van de Steene N, van de Cotte B, Metzlauff M, Van Breusegem F (2007) Silencing of poly(ADP-ribose) polymerase in plants alters abiotic stress signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15150–15155
- Verslues PE, Bray EA (2006) Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J Exp Bot* 57:201–212
- Vidal G, Ribas-Carbo M, Garmier M, Dubertret G, Rasmusson AG, Mathieu C, Foyer CH, De Paepe R (2007) Lack of respiratory chain Complex I impairs AOX engagement and modulates redox signaling during elicitor-induced cell death in tobacco. *Plant Cell* 19:640–655
- Wilkinson S, Davies WJ (2002) ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* 25:195–210