



HAL
open science

Le rôle de la PTOX dans l'acclimatation des plantes alpines aux conditions extrêmes

Constance Laureau

► **To cite this version:**

Constance Laureau. Le rôle de la PTOX dans l'acclimatation des plantes alpines aux conditions extrêmes. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112125 . tel-01022824

HAL Id: tel-01022824

<https://theses.hal.science/tel-01022824>

Submitted on 11 Jul 2014

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.



UNIVERSITE PARIS-SUD XI – UFR des Sciences

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VEGETAL

Thèse

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD
(Biologie)**

Par

Constance LAUREAU

Le rôle de la PTOX dans l'acclimatation des plantes alpines aux conditions extrêmes

Spécialité : Ecophysiologie végétale

Soutenue le **10 juillet 2012**, devant le jury d'examen:

Serge AUBERT, Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble, France	Examineur
Michel DRON, Professeur, Université Paris Sud XI, Orsay, France	Examineur
Neil BAKER, Professor, University of Essex, Essex, United Kingdom	Rapporteur
Giovanni FINAZZI, Directeur de recherche, CEA, Grenoble, France	Rapporteur
Anja KRIEGER-LISZKAY, Directeur de recherche, CNRS, Saclay, France	Examineur
Peter STREB, Maître de Conférences, Université Paris Sud XI, France	Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement Peter Streb qui m'a accueillie au sein de l'ESE et a accepté de diriger cette thèse. Je le remercie de m'avoir initié à la recherche, et je le remercie pour sa patience, son ouverture d'esprit et la liberté qu'il m'a laissée.

Je tiens à remercier Neil Baker et Giovanni Finazzi d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie Bill Gould qui m'a permis il y a quelques années de découvrir l'univers des plantes dans les milieux froids, je lui en suis particulièrement reconnaissante. Je remercie aussi chaleureusement Nadya Matveyeva et Olga Makarova pour leur enthousiasme lors de cette mission et leurs encouragements.

Je remercie Charles Warren qui m'a accueillie dans son équipe pendant mon année de césure et m'a fait partager ses connaissances sur les échanges gazeux et la fluorescence, et qui m'a beaucoup appris.

Je remercie Marcel Kuntz pour sa participation aux comités de thèse qui ont jalonné ces années, pour son intérêt, ses critiques constructives et ses conseils intéressants, mais aussi pour son accueil au CEA de Grenoble. Je le remercie également pour le don d'anticorps anti-PTOX. Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidée et conseillée lors de mon séjour au CEA de Grenoble, particulièrement Gilles Curien et Lucas Moyet.

Je remercie Guillaume Tcherkez, pour sa participation aux comités de thèse, pour ses conseils utiles et pour son soutien précieux lors d'une deuxième année de terrain un peu agitée.

Je remercie Serge Aubert, d'avoir bien voulu juger ce travail, mais aussi pour son intérêt et son enthousiasme concernant l'écophysiologie végétale à la station Alpine du Lautaret.

Anja Krieger-Liskay, qui a bien voulu juger le travail réalisé, m'a accueillie au CEA de Saclay avec beaucoup de sympathie et qui a continué à s'intéresser aux résultats obtenus, je l'en remercie vivement.

Michel Dron, qui a toujours porté un grand intérêt à ce travail et animé l'école doctorale avec chaleur, merci d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Jacqui Shykoff, Marianne Delarue, Hoang Hothi et Marielle Fradin, merci pour votre présence, votre disponibilité et votre aptitude à simplifier toutes les démarches ayant trait à l'école doctorale.

Je voudrais aussi remercier Rolland Douzet, Christophe Perrier et Pascal Salze pour leur accueil chaleureux au Lautaret, autant autour d'un bon repas à la table du chalet Mirande que pour l'aide aux manip à une heure avancée de la soirée.

Je remercie aussi Karl Grigulis, pour son travail essentiel à l'organisation de la vie commune au chalet labo et sa bonne volonté pour faciliter autant les commandes de dernière minute que les organisations un peu compliquées comme l'accueil de lycéens en pleine saison.

Je remercie vivement Harold Duruflé et Valérie Guittet, pour leur aide précieuse sur le terrain, leur bonne humeur, leur joie de vivre et leur amitié. Pensée émue pour feu l'Aigle et feu la Princesse. Je remercie aussi vivement Maria Moreno Chacon, avec qui ce fut un réel plaisir de travailler.

J'adresse aussi un grand merci à tous ceux qui ont fait le quotidien de ces saisons de terrain, avec de très bons moments et de belles rencontres : Marie Pascale, ManuE, Sandrine, je me souviendrais longtemps de cette première année de terrain. Jonathan, Nico, Jessie, Edith, Patrick, Simon, Emeline, Marjorie, Aloïs, Fabrice, Sébastien, Marco, Mark, Aymeric, je vous souhaite le meilleur.

Je remercie vivement Jean Yves Pontaillier pour sa disponibilité et son aide précieuse pour les manip sur le terrain, notamment par téléphone. Je remercie aussi Lionel Saunois et Amandine Dubois pour leur aide indispensable à la serre.

Je remercie Christophe François, grâce à qui j'ai pu réaliser les spectres de transmittance des feuilles de Renoncule et Soldanelle.

Mes remerciements vont également à Dominique Rumeau, pour le don d'anticorps anti-NDH.

Je remercie très chaleureusement Rosine de Paepe, qui m'a très régulièrement accueillie dans son laboratoire et qui m'a consacré beaucoup de temps, aussi bien pour améliorer les protocoles d'extractions et de révélation immuno, que pour me conseiller, discuter, aider à la réalisation d'expériences.

Je remercie aussi chaleureusement Jean Marc Ducruet qui m'a initié aux mesures de fluorescence et de thermoluminescence, et pour son intérêt pour l'avancement du travail réalisé sur la PTOX.

Je tiens aussi à remercier Gabriel Cornic pour son intérêt sur le sujet, le temps qu'il a consacré à ce travail, ses conseils et commentaires très utiles. Je le remercie de m'avoir fait partager sa connaissance des échanges gazeux et de la photosynthèse et pour sa présence particulièrement utile lors des expérimentations.

Je remercie Zoran Cerovic et Sebastien Bellow pour leurs conseils et réflexions sur les protocoles expérimentaux, et leur aide précieuse, parfois tard le soir. Je remercie Sylvie Meyer, avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer sur les UV. Un très grand merci à Gwendal Latouche pour l'aide qu'il m'a apportée pour les montages expérimentaux. Chacun rêverait de travailler dans une équipe comme la vôtre, où l'aide souriante et les commentaires précieux arrivent avant même qu'on l'ait demandé.

Un très grand merci aussi à Samuel Mainguet, qui s'est intéressé de près au génome de la Renoncule des glaciers et pour son enthousiasme chaleureux et communicatif. Un très grand merci aussi à ma sœur Raphaëlle, avec qui j'ai été très heureuse de travailler. Je te souhaite beaucoup de bonheur pendant ta thèse.

Je voudrais aussi remercier toutes les membres du département Ecophysiologie qui m'ont accompagnée pendant ces années et les doctorants ou ATER, pour les bons moments partagés, Nicolas, Alice, Alice (merci beaucoup pour ta relecture !), Claire, Gabriel, Joanès, Angélique, Romain, Louise, Elsa et Céline.

Je suis reconnaissante à ma famille d'avoir cru en moi dès le début de mes études et de m'avoir soutenue pendant ces années.

Je remercie particulièrement Constance, Géraldine, Sibil, Prune, Naïma, Lucie, Laurent et Juliette pour leur amitié qui m'est très précieuse.

Elie, tout cela n'aurait pas été possible sans ta présence, ton soutien et ... ton humour. Merci.

Avant propos

Le travail expérimental de cette thèse a été réalisé sous la direction de Peter Streb, dans deux structures de recherche :

- **Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution**, UMR 8079 Université Paris XI / CNRS, bât. 362, 91405 Orsay
- **Station Alpine Joseph Fourier**, UMS 3370 Université Joseph Fourier / CNRS, Col du Lautaret, 05480 Villar d'Arène

Within the present manuscript, introduction and methods were written in French to facilitate access to people who are not aware of the subject, but results and discussion were written in English.

We were very proud that a journalist/drawer from the famous kid's paper "Le Journal de Spirou" came to the Alpine Station to write about ongoing research and mentioned PTOX (next pages).



LE LABO
Les plus grands
laboratoires scientifiques
y dévoilent leurs secrets.

LE LABO

Scénario, Dessin & Couleur
JEAN-YVES DUHOO

AU COL DU LAUTARET



LE COL DU LAUTARET,
À 2100 MÈTRES D'ALTITUDE,
ENTRE GRENOBLE ET BRIANÇON...

... OÙ SE TROUVE LE JARDIN BOTANIQUE ALPIN.

LE COL DU LAUTARET, C'EST UN
SITE GÉOGRAPHIQUE PRIVILÉGIÉ...



... qui se trouve à LA CROISÉE DES ALPES
DU SUD...



CETTE GRANDE VARIÉTÉ CLIMATIQUE ET GÉOLOGIQUE
FAIT QU'ON TROUVE DANS LA RÉGION PLUS DE 1500
ESPÈCES DE PLANTES, SOIT PLUS DU TIERS
DE TOUTE LA FLORE FRANÇAISE.

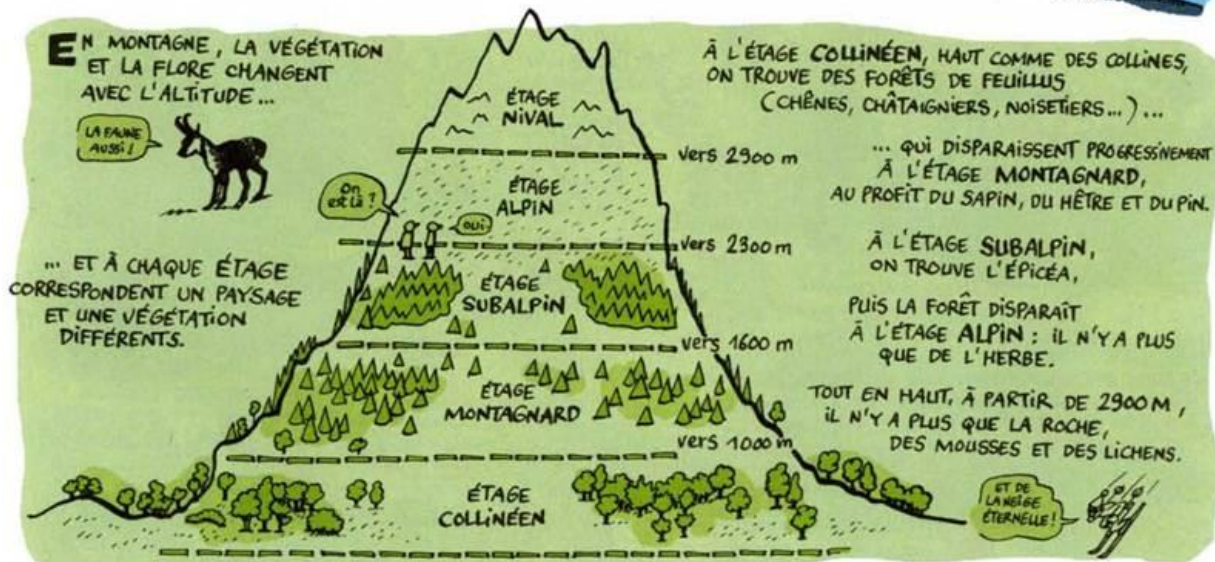


IL Y A PEU D'ENDROITS
COMME ÇA
DANS LE MONDE.



À 20 KM À LA
RONDE, ON
TROUVE PLUS
DE PLANTES
QUE DANS
TOUTE
L'ANGLETERRE!

Le Jardin botanique alpin du Lautaret, ou jardin d'altitude des cinq continents, fait partie de la Station alpine Joseph Fourier. Il a été créé en 1899 par un professeur à l'université de Grenoble, Jean-Paul Lachmann, mais le site du col du Lautaret était connu depuis le XVIII^e siècle pour sa richesse botanique. L'entretien du Jardin est assuré aujourd'hui par l'université de Grenoble et le CNRS.



Pour les noms donnés aux plantes, la classification de Linné (botaniste suédois du XVII^e siècle) fait autorité: d'abord le nom de famille, puis le nom de genre et enfin celui d'espèce; le tout en latin pour une compréhension internationale. Par exemple, la plante (Primulaceae) Soldanella alpina correspond au nom botanique complet de la Soldanelle des Alpes, une plante qui appartient à la famille des primevères (Primulaceae).

LES PLANTES ALPINES, ON NE LES TROUVE PAS QUE DANS LES ALPES. ON PEUT TROUVER DES PLANTES ALPINES DANS LE CAUCASE, OU AU CHILI.

CE NE SONT PAS NÉCESSAIREMENT DES PLANTES QUI POUSSENT À LA MÊME ALTITUDE QU'ICI, MAIS QUI ONT BESOIN DES MÊMES CONDITIONS CLIMATIQUES.



ICI, UN PAVOT DE L'HIMALAYA. IL Pousse À 3500 M, MAIS ICI, ON A LES MÊMES CONDITIONS À 2000M.

LE JARDIN SERT À MONTRER LES PLANTES AUX VISITEURS, MAIS AUSSI À LA CONSERVATION DES ESPÈCES MENACÉES.



C'EST DIFFICILE D'ACCLIMATER DE NOUVELLES PLANTES. ON LES FAIT GERMER DANS UN LABO, À GRENOBLE, PUIS ON LES FAIT GRANDIR DANS DES POTS, À L'ABRI D'UN TROP FORT SOLEIL D'ALTITUDE.



CERTAINES PLANTES S'ACCLIMATENT TRÈS FACILEMENT, POUR D'AUTRES, C'EST PLUS DIFFICILE. CERTAINES N'Y ARRIVENT JAMAIS!

AH, C'EST PAS COMME NOUS!

L'OXYDASE TERMINALE P-TOX EST PRÉSENTE EN FORTE CONCENTRATION DANS LES CHLOROPLASTES.

UNE STRATÉGIE D'ACCLIMATATION SPÉCIFIQUE À L'ALTITUDE.



Dans le Jardin, les plantes sont présentées selon plusieurs thèmes: leur origine géographique (les Alpes, l'Himalaya, les Andes, les régions arctiques...); leur milieu de vie d'origine (pelouses, éboulis, rochers, marais...); leurs propriétés (plantes médicinales, plantes alimentaires, plantes toxiques); et enfin leur taxonomie (leur classification par famille).

BEAUCOUP DE RECHERCHES PORTENT SUR L'ADAPTATION DES PLANTES EN MILIEUX EXTRÊMES, DANS DES TEMPÉRATURES TRÈS FROIDES, TRÈS SÈCHES...

ET NOTAMMENT L'ADAPTATION DES PLANTES AUX CHANGEMENTS CLIMATIQUES.



SOUS L'EFFET DU RÉCHAUFFEMENT, ON CONSTATE QUE CERTAINES POPULATIONS DE PLANTES SE DÉPLACENT EN ALTITUDE, POUR RETROUVER LA MÊME TEMPÉRATURE.

DE L'AIR!

POUR CELLES QUI SONT EN BAS, ÇA VA...

MAIS CELLES D'EN HAUT?

ELLES DISPARAISSENT VERS LE PARADIS DES PLANTES!



LA PULSATILLE DES ALPES VA REMONTER EN ALTITUDE... OU DISPARAITRE DES MASSIFS DE MOYENNE ALTITUDE.

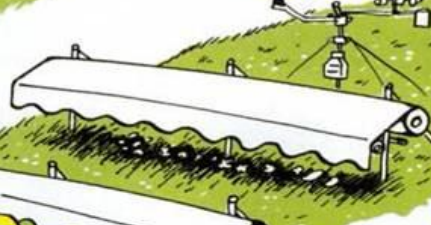
ÇA, C'EST UNE EXPÉRIENCE DE MODIFICATION DE CLIMAT, DESTINÉE À CRÉER UN STRESS CHEZ LA PLANTE.

LES STORES EMPÊCHENT LA CHALEUR DE S'ÉCHAPPER LA NUIT...

...EN CONFINANT LES RAYONNEMENTS INFRAROUGES THERMIQUES.

PUIS ON MESURE LA CAPACITÉ DE LA PLANTE À TOLÉRER LES CONDITIONS DE STRESS CRÉES.

5 DEGRÉS DE PLUS, PAS D'EAU...



ON CRÉE DES CONDITIONS DE CANICULE.

À VUE DE NEZ, ON NE CONSTATE PAS BEAUCOUP D'EFFETS... POUR QUE ÇA SOIT VALABLE, IL FAUT EXPÉRIMENTER SUR LE LONG TERME.

PLUSIEURS ESPÈCES RARES SONT MENACÉES DANS LES ALPES. D'ICI À 2050, ON POURRAIT EN PERDRE JUSQU'À 50%...

EN MÊME TEMPS, ON CONNAÎT MAL LES CAPACITÉS D'ADAPTATION DES PLANTES ALPINES... ON VERRA BIEN.

ON VA CONTINUER LONGTEMPS.



Résumé

Le climat alpin à plus de 2400 mètres d'altitude est caractérisé par des fortes variations de température et des intensités lumineuses très élevées ($3000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) qui sont connues pour générer un état de réduction important de la chaîne de transport des électrons photosynthétique. Le bon fonctionnement du processus photosynthétique est primordial pour les quelques espèces de plantes vasculaires qui sont présentes dans les hauteurs de l'étage alpin et qui doivent terminer leur cycle de vie au cours d'une période de végétation particulièrement courte. *Soldanella alpina* et *Ranunculus glacialis* sont deux espèces inféodées aux étages alpin et nival. Sur leurs sites de croissance nous avons mesuré des températures faibles (0.7°C) et fortes (43°C) sous des lumières supérieures à $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Chez les espèces non-alpines ces conditions induisent la photoinhibition du PSII, ce qui est évité chez *S. alpina* et *R. glacialis*, par des mécanismes très différents. Les systèmes antioxydants et le quenching non photochimique sont particulièrement importants chez *S. alpina*. Chez *R. glacialis*, la photorespiration reste très importante et un contenu élevé en Plastid Terminal Oxidase (PTOX) a été décrit. Le rôle des antioxydants et de la PTOX dans la photoprotection des deux espèces ont été étudiés. Dans une partie de cette thèse, nous avons montré qu'une diminution de la capacité antioxydante, par une diminution de la concentration en glutathion, n'affecte pas la tolérance vis-à-vis de la photoinhibition à basse température. Dans une deuxième partie, les résultats supposent qu'une surexpression de la PTOX chez le tabac augmente la photoinhibition sous forte lumière par production d'espèces réactives de l'oxygène. En utilisant différentes conditions environnementales de croissance pour *Ranunculus glacialis*, nous avons pu montrer que l'expression de la PTOX est induite par des fortes lumières et non pas par des basses températures. Grâce à une approche associant mesures d'échanges gazeux et mesures de la fluorescence de la chlorophylle, nous avons montré qu'un flux d'électrons conséquent vers l'oxygène, indépendant de la photorespiration, corrèle avec la présence de la PTOX. Mais, cette activité liée à la PTOX n'est pas maximale sous des conditions qui permettent l'assimilation du CO_2 et la photorespiration. Grâce à des mesures de fluorescence chlorophyllienne en présence de différents inhibiteurs photosynthétiques, nous avons pu montrer que l'importance de ce flux d'électrons vers l'oxygène corrèle avec la quantité de PTOX présente dans les feuilles, dans des conditions réductrices. Ces résultats nous ont amenés à conclure que chez *Ranunculus glacialis*, la PTOX peut prendre en charge un flux significatif d'électrons, éviter ainsi l'apparition d'un état réduit de la chaîne de transfert photosynthétique, et protéger la plante vis-à-vis de la photoinhibition en agissant comme une valve de sécurité, sous les conditions du climat alpin.

Abstract

The alpine climate above 2400 meters altitude shows large variations in temperature and very important light intensity ($3000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), which are known to generate a state of significant reduction in the photosynthetic electron transport chain. The proper functioning of the photosynthetic process is essential for vascular plants species that are present in this alpine environment and must complete their life cycle within a very short growing season. *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* are two species restricted to high altitude and snow valleys. In their natural growth environment we measured low (0.7°C) and high temperatures (43°C) at light intensities above $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In non-alpine species such conditions induce photoinhibition of PSII, which is avoided in *S. alpina* and *R. glacialis*, by very different mechanisms. Antioxidant systems and non-photochemical quenching are particularly important in *S. alpina*. In *R. glacialis*, photorespiration and contents of Plastid Terminal Oxidase (PTOX) remain high. The photoprotective function of antioxidants and of PTOX was investigated in both species. In one part of the thesis, we showed that decreasing the concentration of glutathione and hence, the antioxidant capacity, did not affect the tolerance to low-temperature-induced photoinhibition. In a second part, overexpression of PTOX in tobacco leaves enhanced strong light-induced photoinhibition as a result of increased reactive oxygen species formation.

Using different growing conditions for *Ranunculus glacialis*, we showed that a high PTOX content is induced by strong light, but not by low temperatures. By combining gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements, we showed that a significant electron flow to oxygen, independent of photorespiration, was measured in plants with high PTOX content. This electron flow to oxygen correlated with the PTOX content of leaves under reducing conditions when electron transport was blocked by DBMIB. These results were interpreted in that PTOX activity of *R. glacialis* leaves can maintain a significant electron flow under reducing conditions, thus avoiding photoinhibition and acting as a safety valve under alpine conditions.

Liste des abréviations

ADP : adénosine diphosphate

APX : Ascorbate peroxydase chloroplastique

APXt : Ascorbate peroxydase associée à la membrane du thylacoïde

APXc : Ascorbate peroxydase cytoplasmique

ATP : adénosine triphosphate

Chl : chlorophylle

CO₂ : dioxyde de carbone

Cyt b6/f Complexe protéique contenant le Cytochrome *b6* et le cytochrome *f*

kDa : kilodalton

DBMIB: 2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone

DCMU: 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl urée

DTT : dithiothréitol

EDTA : ethylene diamine tetra acetic acid

Fm: fluorescence maximale de la chlorophylle

F0: fluorescence minimale de la chlorophylle

Fd: ferrédoxine

FMN: flavine mononucléotide

FNR: ferrédoxine-NADP⁺ oxydoréductase (EC 1.18.1.2)

F' fluorescence de la chlorophylle à l'état stationnaire

Fv fluorescence de la chlorophylle

Hepes : acide N-[2-hydroxyéthyl] piperazine-N'[2-éthane] sulfonique

LHC: complexe collecteur d'énergie lumineuse

LHCI ou II: complexe chlorophylle/proteine collecteur d'énergie lumineuse du photosystème

I ou II

NAD(P) : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)

NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit

Ndh: complexe NAD(P)H déshydrogénase chloroplastique

P680: centre réactionnel du PS II

P700: centre réactionnel du PS I

PAGE: gel électrophorétique de polyacrylamide

PAR : Photosynthetic Active Rate ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

PFD : Photon flux density ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

pb: paires de bases

PC: plastocyanine

3-PGA acide 3-phosphoglycérique

PQ: plastoquinone

PQH2: plastoquinol (Plastoquinone réduite)

PSI et PSII: photosystème I et Photosystème II

PTOX: oxydase terminale chloroplastique

ROS : Reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène

Rubisco: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase

RuBP : ribulose 1,5 bisphosphate

SDS: Dodécyl sulfate de sodium

SOD : superoxyde dismutase

Tris : Tris [hydroxyméthyl] aminométhane ou trizma base

Table des matières

Remerciements

Avant propos

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

1. Chapitre 1 : Introduction – Analyse bibliographique	7
1.1 Contexte	
1.1.1 L'environnement alpin	10
1.1.2 Conséquences pour les plantes alpines	11
a. Pression atmosphérique	11
b. Température.....	13
c. Rayonnement solaire.....	17
d. Rayonnement UV.....	20
e. Adaptations générales des plantes alpines.....	21
f. Niches climatiques.....	23
g. <i>Ranunculus glacialis</i> L. (Ranunculaceae).....	27
h. <i>Soldanella alpina</i> L. (Primulaceae).....	34
1.2 Le chloroplaste et la photosynthèse.....	37
1.2.1 Organisation des chloroplastes.....	37
1.2.2 Réactions primaires	40
a. Absorption de l'énergie lumineuse, transfert linéaire d'électrons.....	40
b. Organisation des membranes thylacoïdiennes.....	43
c. Composition de la chaîne de transfert des électrons.....	43
d. Génération de pouvoir réducteur, d'un gradient de protons transmembranaire et synthèse d'ATP.....	45
1.2.3 Réactions secondaires	47
a. Assimilation photosynthétique du CO ₂	47
b. Photorespiration.....	48
c. Respiration à l'obscurité et à la lumière.....	51

d.	Augmentation de la capacité du métabolisme photosynthétique en réponse à une absorption d'énergie en excès....	52
1.3	Génération du stress photo-oxydant	55
1.3.1	Conditions réductrices.....	55
1.3.2	Photoinhibition.....	55
1.3.3	Espèces réactives de l'oxygène	56
1.4	Equilibrer l'absorption d'énergie lumineuse et le métabolisme photosynthétique.....	58
1.4.1	Adapter l'absorption de lumière	58
1.4.2	Dissipation de l'énergie en excès.....	59
1.4.3	Détoxifier les ROS : antioxydants et enzymes antioxydantes.....	62
1.4.4	Réponse à l'UV.....	68
1.5	Voies alternatives de consommation d'électrons.....	69
1.5.1	Réactions de Mehler.....	69
1.5.2	Valve du malate.....	71
1.5.3	Transferts cycliques autour du PSI.....	72
1.5.4	Chlororespiration.....	74
1.6	Protéines carboxylates diferriques non héminiques et transfert alternatif d'électrons.....	76
1.6.1	Le mutant <i>Immutans</i>	76
1.6.2	L'alternative oxydase mitochondriale.....	78
1.6.3	PTOX.....	79
2.	Chapitre 2 : Matériel et Méthodes.....	85
2.1	Matériel végétal.....	87
2.1.1	<i>Ranunculus glacialis</i> L.	
2.1.2	<i>Soldanella alpina</i> L.	
2.1.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	
2.1.4	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	

2.2 Expériences sur le matériel végétal.....	87
2.2.1 2700 mètres, Col du Galibier.....	90
2.2.2 2400 mètres, Combe Roche Noire.....	90
2.2.3 2400 mètres, barre calcaire.....	91
2.2.4 2100 mètres, Station Alpine du Lautaret.....	92
2.2.5 0 mètre, Chambre froide, Orsay.....	92
2.3 Mesure du climat.....	92
2.4 Florescence chlorophyllienne.....	93
2.4.1 Introduction.....	93
2.4.2 Le rendement quantique du PSII.....	95
2.4.3 Le quenching de la fluorescence.....	98
2.4.4 Mesure de la fluorescence chlorophyllienne.....	99
2.5 Echanges gazeux.....	101
2.5.1 Mesure des échanges gazeux.....	101
2.5.2 Réponse de l'assimilation nette de CO ₂ à l'intensité lumineuse incidente.....	105
2.5.3 Réponse de l'assimilation nette de CO ₂ à la concentration de CO ₂ dans l'air.....	105
2.5.4 Electrode à oxygène.....	106
2.6 Estimation des flux d'électrons vers le CO ₂ et l'O ₂	107
2.6.1 Estimation du flux d'électrons au niveau du PSII et du rendement quantique de l'assimilation du CO ₂	107
2.6.2 Estimation de la respiration à la lumière.....	109
2.6.3 Estimation de la photorespiration.....	112
2.6.4 Estimation du flux d'électrons vers l'O ₂ alternatif à la photorespiration.....	115
2.7 Western Blots.....	116
2.7.1 Préparation des protéines insolubles (adapté de Josse, 2003).....	116

2.7.2	Dosage des protéines.....	117
2.7.3	Electrophorèses.....	118
2.7.4	Immunodétection.....	118
2.7.5	Révélation.....	119
2.8	Mesures de photoinhibition.....	122
2.8.1	Réponse à différentes inhibitions de la photosynthèse et de la chaîne de transfert.....	122
2.8.2	Réponse à la lumière.....	124
2.9	Dosage des pigments.....	124
2.10	Activités enzymatiques.....	125
2.10.1	Dosage des protéines totales.....	125
2.10.2	Catalase.....	126
2.10.3	Glycolate oxydase.....	127
2.10.4	Glutathion réductase.....	127
2.10.5	Ascorbate peroxydase.....	127
2.10.6	Glutathion.....	128
2.10.7	Acide ascorbique.....	128
3.	Chapitre 3 : PTOX promotes oxidative stress when overexpressed in tobacco.....	130
3.1	Introduction.....	132
3.2	Paper 1.....	133
3.3	Influence of high amounts of PTOX on net CO ₂ assimilation and alternative electron flow towards oxygen.....	141
3.4	Discussion.....	145
4.	Chapitre 4 : The significance of glutathione for photoprotection at contrasting temperature in the alpine plant species <i>Ranunculus glacialis</i> and <i>Soldanella alpina</i>.....	147
4.1	Introduction.....	149
4.2	Paper 2.....	151

4.3 <i>Ranunculus glacialis</i> physiology doesn't change with altitude.....	167
4.4 Discussion.....	174
5. Chapitre 5 : PTOX as a security valve for excess excitation energy in the alpine plant species <i>Ranunculus glacialis</i>.....	175
5.1 Introduction.....	177
5.2 Paper 3.....	178
General discussion.....	222
Références bibliographiques.....	231
Annexe 1.....	244
Annexe 2.....	245
Annexe 3.....	246

Chapitre 1

/

Chapter 1

Chapitre 1 : Introduction – Analyse bibliographique

L'environnement alpin constitue un milieu contraignant pour la plupart des plantes supérieures: peu d'espèces peuvent vivre en haute altitude où la période de végétation diminue beaucoup, l'intensité lumineuse et le rayonnement ultraviolet augmentent, et les extrêmes de température prévalent. L'étude des mécanismes d'acclimatation de ces espèces permet d'aborder la variété des réponses physiologiques des plantes à des contraintes abiotiques.

Les espèces présentes aux étages alpin et nival, en grande majorité pérennes, montrent dans la plupart des cas des adaptations morphologiques permettant d'éviter les effets négatifs des extrêmes climatiques. l'un des enjeux est d'accumuler suffisamment de réserves durant une saison de croissance particulièrement courte. Dans ce cadre, le bon fonctionnement de la photosynthèse est primordial pour assurer l'apport de carbone nécessaire à l'accumulation de réserves suffisantes. Dans les conditions climatiques contrastées (fortes intensités lumineuses associées à des extrêmes de température) qui prévalent les systèmes photosynthétiques peuvent être dans état réduit, générateur de dommages comme la photoinhibition. .

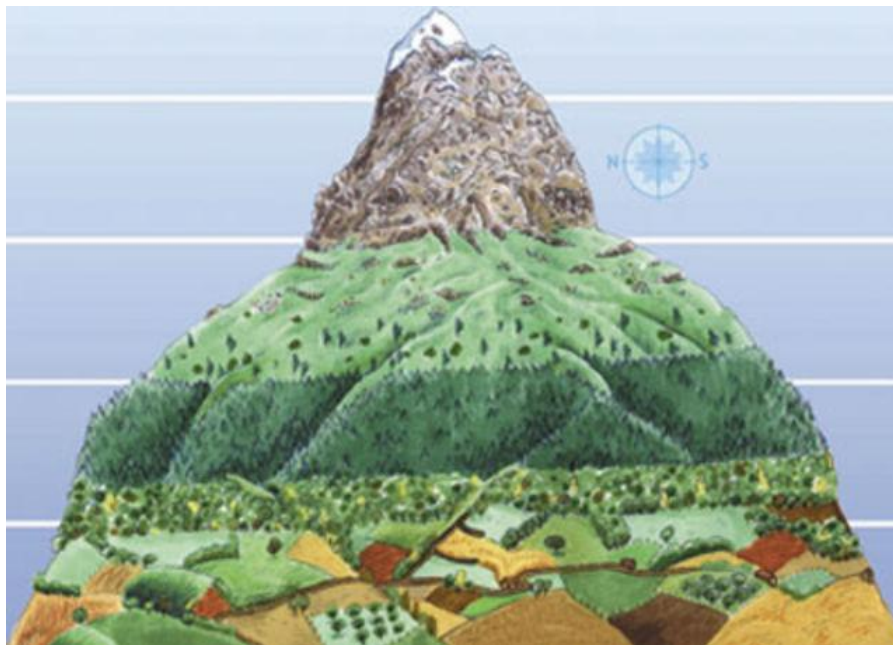
De nombreux processus d'acclimatation physiologique du métabolisme photosynthétique sont décrits chez les plantes alpines. Ces mécanismes prennent une importance particulière chez les espèces qui ne montrent pas d'adaptation morphologique, comme la Renoncule des glaciers ou la Soldanelle des alpes en particulier.

Les capacités, et la variété des mécanismes permettant d'éviter la réduction de la chaîne de transfert d'électrons entre le PSII et le PSI, ou limitant les conséquences de cette réduction sur la feuille, apparaissent variables d'une espèce à l'autre. En particulier, la découverte d'une oxydase terminale chloroplastique, la PTOX, capable de réoxyder les plastoquinones réduites par l'activité du PSII en transférant les électrons en excès vers l'oxygène, et particulièrement abondante chez *Ranunculus glacialis* suggère bien que la flore alpine est utile pour l'étude de la variabilité physiologique.

1.1 Contexte

1.1.1. L'environnement alpin

La température moyenne et la période de végétation décroissent fortement avec l'altitude (Körner 2003). A partir de 2000 mètres, les précipitations sous forme de neige sont régulières durant la période de végétation, l'augmentation de l'intensité lumineuse et du rayonnement ultraviolet est considérable, et les extrêmes de température prévalent. La pression de l'air diminuant, la question de la limitation en CO₂ due à une baisse de la pression partielle se pose pour les plantes alpines. Gel, avalanches et éboulements peuvent constituer des perturbations physiques importantes.

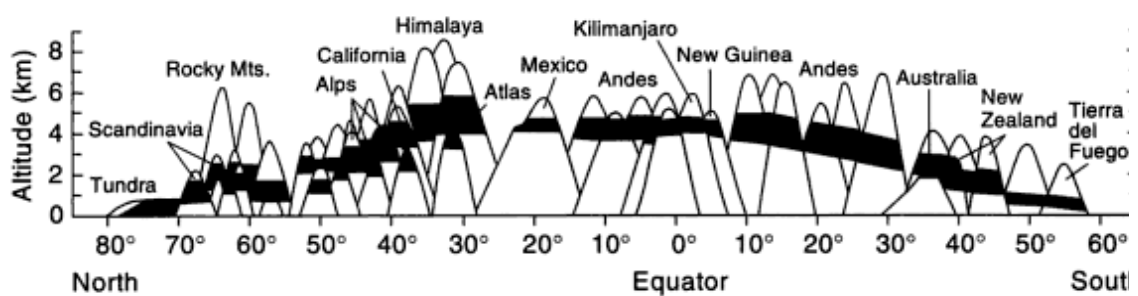


(Fig1.) Illustration de l'étagement alpin par **Benoi Lacroix** ©
(<http://www.benoi.be/>)

En montagne, la distribution de la végétation est caractérisée par un étagement. On distingue l'étage subalpin où les arbres à feuilles persistantes (mélèzes, épicéas, pins) sont dominants ; l'étage alpin, au dessus de la ligne des arbres, où les prairies à forte diversité spécifique abondent ; l'étage nival enfin, où les précipitations se font uniquement sous forme de neige, et où seules quelques rares espèces de plantes supérieures sont capables de survivre.

La variabilité importante qui définit le milieu alpin créé un environnement généralement très hostile pour les plantes de plaine : les changements rapides des conditions climatiques ainsi que l'amplitude de ces changements leurs sont souvent fatals.

Les plantes alpines sont définies dans cette étude comme étant des plantes supérieures survivant à ce climat. On les retrouve au dessus de la limite des arbres jusque dans l'étage nival, où la neige reste persistante. A l'échelle de la planète, les plantes alpines sont distribuées à des altitudes très variables, qui vont du niveau de la mer dans les régions polaires, à plus de 5000 mètres en Afrique et dans l'Himalaya (Körner 2003).



(Fig.2) Représentation schématique de la distribution des plantes alpines selon un gradient latitudinal (Körner 1999)

Le travail décrit dans cette thèse a été réalisé à l'étage alpin, dans les Alpes françaises. On y retrouve la Renoncule des glaciers, espèce nivale, à partir de 2400 mètres d'altitude, et la Soldanelle alpine entre 2000 et 2600 mètres. Cette dernière est considérée comme une espèce alpine.

1.1.2. Conséquences pour les plantes alpines

a. Pression atmosphérique

- La pression partielle en CO_2 diminue avec l'altitude donc la concentration de gaz en phase liquide (dans le chloroplaste), qui est proportionnelle à la concentration du gaz en phase gazeuse (loi de Henry), diminue. Ainsi, se pose la question de la limitation en CO_2 pour les plantes alpines.
- Cependant, la pression partielle d' O_2 diminuant de la même façon, le rapport CO_2/O_2 n'est pas altéré par l'altitude (Friend et Woodward 1990).

La pression partielle du CO₂ dans les chloroplastes dépend aussi des résistances qu'il rencontre lors de sa diffusion de l'air ambiant vers les sites de carboxylation.

- La résistance de la couche limite, couche d'air calme directement en contact avec la feuille et dont l'épaisseur dépend de l'agitation de l'air autour de la plante.
- La résistance stomatiques, intégrant la densité des stomates, leur taille et leur physiologie (réponse de l'ouverture aux signaux environnementaux)
- La résistance interne, prenant en compte les espaces intercellulaires jusqu'aux parois cellulaires.
- La résistance du mésophylle où la diffusion du CO₂ se fait en phase liquide jusqu'aux sites de carboxylation. Körner (2003), Friend et Woodward (1990), décrivent une augmentation de la densité stomatique avec l'altitude sous des climats tempérés, ce qui peut faciliter la diffusion du CO₂. (Kogami et al. 2001) et (Körner 2003), montrent que la surface d'interaction entre le mésophylle et l'air intercellulaire est plus grande chez plus de 20 espèces alpines étudiées que celle observée en moyenne sur des plantes de plaines. Enfin, alors que la baisse des températures peut induire une viscosité et diminuer la diffusion du CO₂ dans la phase liquide de la cellule, il est suggéré que cette diffusion soit facilitée par des pores et des anhydrases carboniques chez les plantes alpines (Evans et al 2009).

Ainsi, à 3000 mètres d'altitude, il est estimé que le coefficient de diffusion du CO₂ est multiplié par un facteur 1,3, contrebalançant ainsi l'effet de pressions partielles plus basses à hautes altitudes (Terashima et al. 1995).

Chez la Renoncule des glaciers, sous des concentrations atmosphériques de CO₂, la conductance du mésophylle a été estimée à 0.111 mol m⁻² s⁻¹, et la conductance stomatique à 0,140 mol m⁻² s⁻¹, ce qui correspond à un rapport molaire de CO₂ de 150 μmol/mol (Streb et Cornic 2012). Ces valeurs sont plus basses que celles observées chez des plantes cultivées, mais correspondent à celles observées chez les arbres (Evans et Loreto 2000).

En conclusion, c'est la diminution de la conductance du chemin de diffusion des stomates jusqu'aux chloroplastes, plus que la diminution de la pression partielle de CO₂, qui

constituerait le facteur limitant l'assimilation nette du CO₂ à haute altitude (Friend et Woodward, 1990).

b. Température

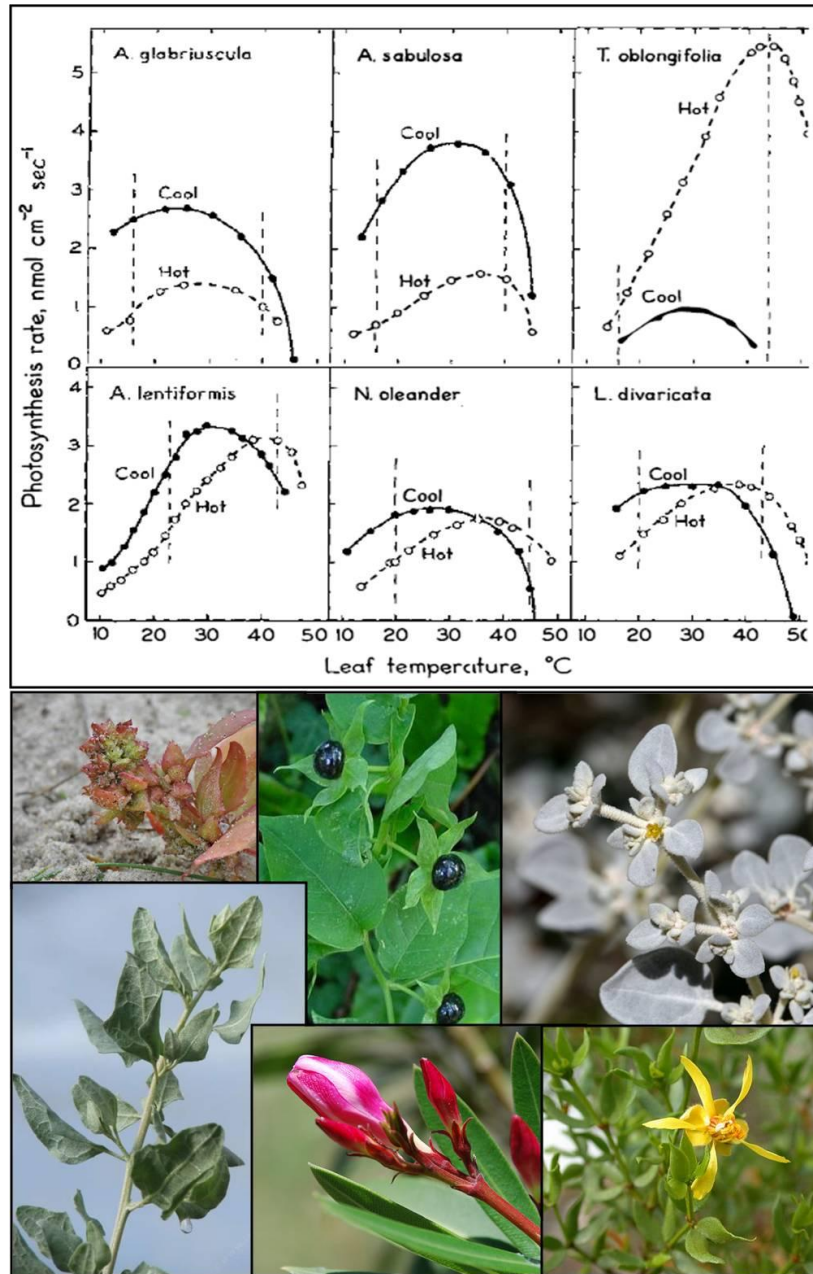
- Avec l'altitude, la température diminue en moyenne de 0,5°C tous les 100m. A l'étage alpin (environ 2000 mètres d'altitude en Europe), la température moyenne annuelle est d'environ 0°C (Friend et Woodward 1990), et la période de végétation moyenne annuelle est de deux mois (Körner 2003, Larcher et Wagner 2009).

A des altitudes plus élevées, les contraintes principales sont des fluctuations de température importantes, un grand nombre de jours avec de la neige, et des gelées nocturnes fréquentes durant la saison de croissance. A la limite supérieure de la distribution des plantes alpines, Körner 2003, Kleier et Rundel 2009, Larcher et al. 2010 décrivent des gammes de températures durant la période de végétation allant de moins de 0°C à plus de 40°C en plein soleil, et variant entre les feuilles et les racines au cours de la même journée.

- Les plantes peuvent montrer une plasticité importante dans leur réponse aux conditions thermiques. Certaines, comme *Nerium oleander*, une plante méditerranéenne qui conserve ses feuilles pendant deux ans au moins, montrent une modification de l'optimum thermique de la photosynthèse sans altération des capacités d'assimilation.

La plasticité de cette réponse thermique varie selon les espèces, certains exemples de cette variabilité sont montrés dans la figure ci-dessous. Certaines espèces présentent des capacités d'acclimatation particulièrement importantes, comme *Heliotropium curassivicum*, qui peut changer son optimum thermique en fonction de la température de croissance (de 20 à 40°C), et conserver la même capacité d'assimilation à l'optimum de température (Berry et Björkman 1980). Pour d'autres espèces, l'apparition d'écotypes peut être associée à une large aire de répartition : les individus d'une même espèce, vivant dans des milieux différents, montrent alors des réponses physiologiques différentes aux changements environnementaux. Par exemple, les populations arctiques d'*Oxyria digyna*

montrent un optimum thermique plus bas que les populations provenant des zones alpines européennes, dans des conditions identiques (Mooney & Billings 1961).



(Fig.3) Effet des régimes thermiques de croissance sur le taux et la dépendance à la température de la photosynthèse, sous lumière saturante et conditions atmosphériques, chez différentes espèces provenant de milieux aux régimes thermiques contrastés. Les traits verticaux en pointillés indiquent les températures subies pendant la journée pour les régimes « chauds » et « froids » pour chaque espèce. (Berry et Björkman, 1980). *Atriplex glabriuscula* est distribuée au nord de l'Europe et de l'Amérique du Nord (Photo J.C. Schou); *Atriplex sabulosa* est distribuée en Europe tempérée et méridionale (Photo L.Michel); *Tidestromia oblongifolia* se trouve au Sud de l'Amérique du Nord (Photo S. Matson); *Atriplex lentiformis* se trouve au Sud de l'Amérique du Nord, et au Mexique (Photo B. Wilson); *Nerium oleander*, originaire du bassin méditerranéen se trouve dans les zones subtropicales; *Larrea divaricata* se trouve dans les déserts d'Amérique du Nord et du Sud (Photo U. Katz).

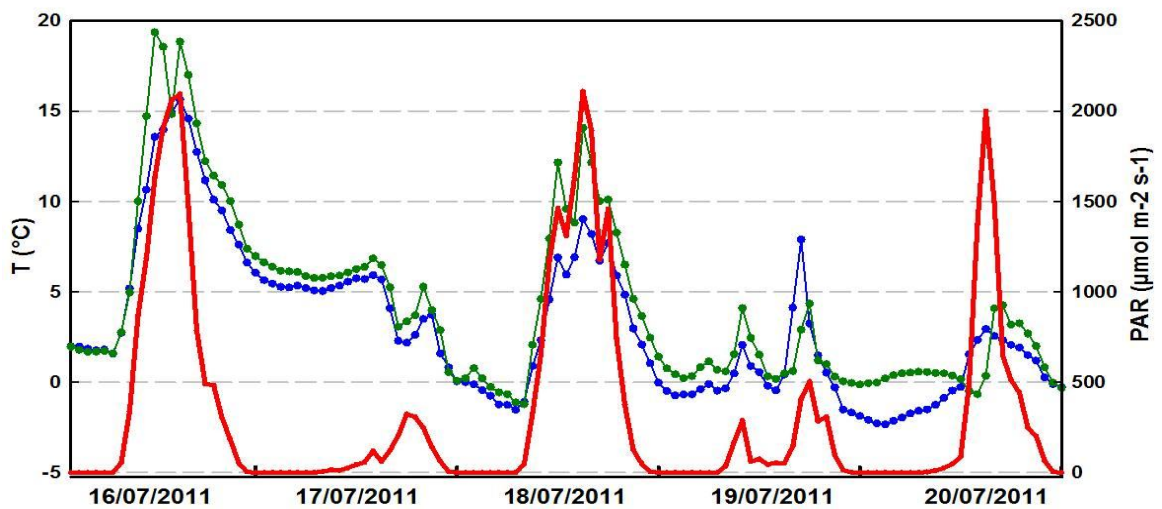
Ainsi, les espèces (et/ou les écotypes) sont chacun acclimatés à des conditions climatiques particulières, et montrent une plasticité variable dans cette acclimatation. *Heliotropium curassivicum*, espèce acclimatée aux milieux chauds, ne survivra pas dans un milieu alpin, et *Ranunculus glacialis*, acclimatée aux milieux froids, ne survit pas en dessous de 2400 mètres d'altitude dans les Alpes (Streb et al. 2003c).

Les températures basses affectent le rythme de la croissance et le développement de la plante et diminuent la période de croissance, notamment quand elles sont associées à des épisodes neigeux. Les extrêmes de températures (associés, ou non, à de fortes lumières) créent des conditions propices à l'apparition de dommages chez la plante : les réactions enzymatiques et les processus de transport des sucres sont très sensibles à la température, alors que les processus d'absorption de la lumière ne le sont pas (Falk et al. 1996) et (Oquist & Huner 2003).

Les activités enzymatiques, les affinités pour un substrat ainsi que les énergies d'activation changent avec la température (Leegood et Edwards 1996). Les sensibilités variables des enzymes à la température, ainsi que des processus de transport affectés, peuvent conduire à l'accumulation de métabolites, particulièrement de sucres et de sucres phosphatés, et ainsi à la limitation en phosphate dans le chloroplaste. Cela a été bien caractérisé après un stress de froid chez des plantes non acclimatées par rapport à des plantes acclimatées (Hurry et al 2000, Streb et al. 2003b).

Des températures élevées peuvent conduire à une augmentation importante de la respiration et affecter la stabilité des membranes et des protéines.

L'optimum de température pour la photosynthèse ne diffère pas vraiment chez les plantes alpines de celui chez les plantes de plaine et est situé entre 16 et 25°C pour la majorité des espèces (Körner et Diemer 1987 ; Rawat et Purohit 1991 ; Körner 2003 ; Germino et Smith 2001). Mais, des extrêmes de température pour lesquels une activité photosynthétique a été mesurée vont de -3°C (*Geum reptans*) à -7°C (*Ranunculus glacialis*) ; et de 38°C (*Soldanella alpina*, *Ranunculus glacialis*, *Geum reptans*) jusqu'à 47°C (*Arctostaphylos uva-ursi*).



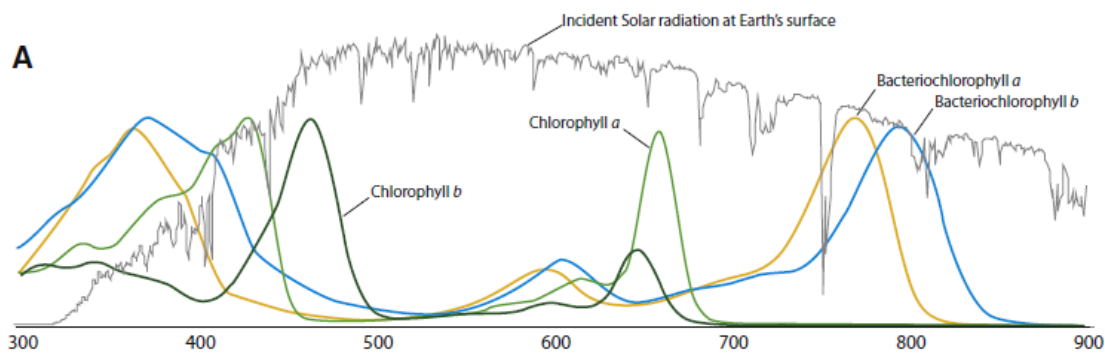
(Fig.4) Exemple de la variabilité climatique à l'étage alpin pendant le mois de Juillet, au milieu de la saison de croissance. Température moyenne (par heure) de l'air (●), température foliaire (●, *Ranunculus glacialis*) et intensité lumineuse moyenne (par heure) (—) ont été mesurées à 2700 mètres.

Malgré un certain degré d'acclimatation de la plante, ces conditions de vie à l'étage alpin restent très peu favorables, notamment à cause du risque de dommage physique et de perte des semences (Kudo 1993, Ladinig et Wagner 2007).

c. Rayonnement solaire

- Le rayonnement est défini comme étant une onde électromagnétique. Le spectre d'irradiation global solaire couvre approximativement une bande spectrale allant de 300 à 4000 nm.

L'énergie totale émise par le soleil est distribuée entre les UV (100-380nm, 7%), le visible (380-750nm, 46%) et l'infrarouge (47%). Cependant, le spectre extra-terrestre est significativement modifié par la composition de l'atmosphère, qui est composée principalement de N₂ (78%) et d'O₂ (21%), mais aussi de nombreux autres gaz en très petites quantités qui jouent un rôle dans la modification du spectre solaire (par ex. ozone). Ces molécules dans l'atmosphère peuvent être responsables de la diffusion mais aussi de l'absorption de certaines longueurs d'ondes (dans ce cas, l'énergie du photon est transformée en chaleur, ce qui induit une réduction dans l'intensité du rayonnement).

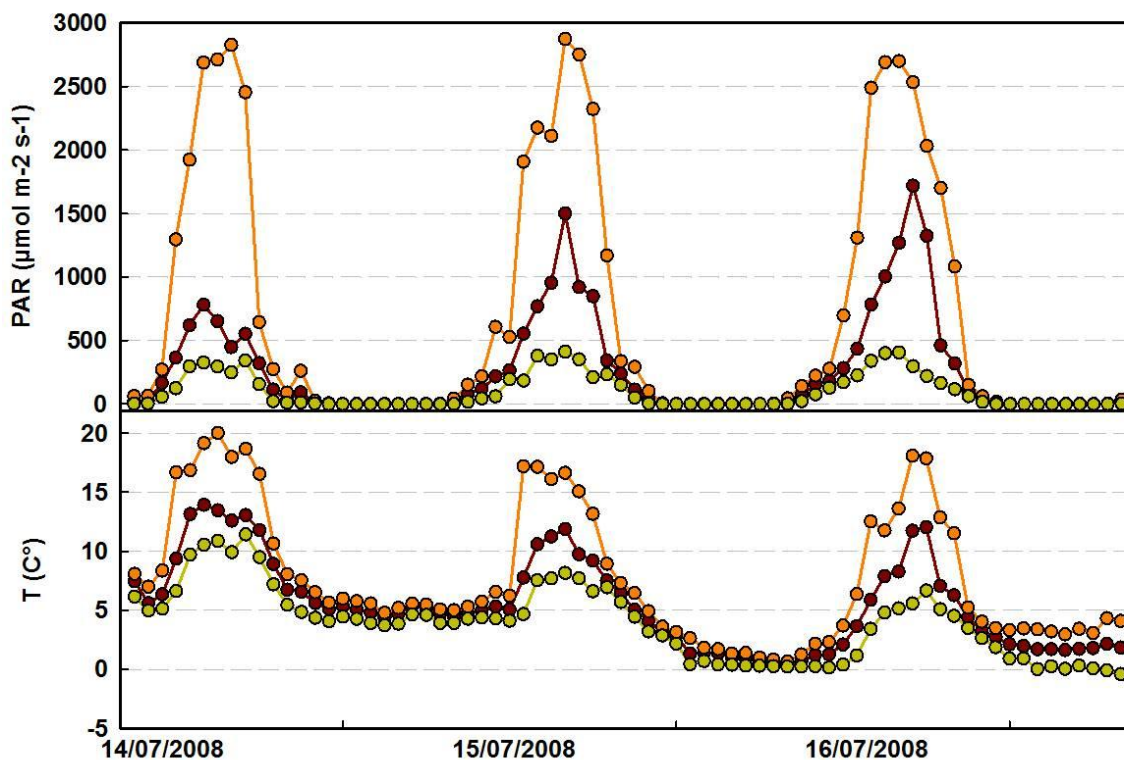


(Fig.5) Spectre de la lumière solaire incidente et spectre d'absorption des chl a et b (dans le méthanol). L'irradiation spectrale présente un pic à environ 500 nm et plusieurs bandes d'absorption dominantes dues au CO₂ et à la vapeur d'eau atmosphérique. Vers 300 nm, le spectre présente une coupure nette liée à l'effet de filtration de l'ozone stratosphérique (Source : Mc Connell 2000).

La lumière visible correspond au rayonnement compris entre 380 et 750 nm. Le PAR (Photosynthetic Active Radiation) correspond à l'intégrale des radiations à des longueurs d'onde comprises dans la gamme 400-700nm : il a une signification importante pour la photosynthèse. Le PFD (Photon Flux Density) correspond à la même mesure et ces paramètres sont exprimés en $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A haute altitude, étant donné que la pression de l'air est moindre, la concentration en aérosols diminue : la somme des molécules piégeant les photons diminuant, l'irradiance globale augmente, ainsi que le rayonnement direct.

- Néanmoins, les intensités lumineuses moyennes sont proches de celles trouvées dans les plaines (Körner 2003), mais ces intensités présentent une forte variabilité, avec des pics dépassant largement l'intensité de saturation de la photosynthèse (Li et al. 2009).



(Fig.6) Exemple de la variabilité de l'intensité lumineuse reçue par une feuille de *Ranunculus glacialis*, à 2400m, au milieu de la saison de croissance. Le capteur de PAR suit l'orientation de la feuille, les valeurs du PAR reçues sont enregistrées toutes les 30 secondes et il est possible d'obtenir pour chaque heure d'enregistrement la valeur maximale (●), la valeur minimale (●), et la valeur moyenne (●). La température de la feuille est mesurée en parallèle et dans la plupart des cas, la température de la feuille varie avec l'intensité de l'éclairement.

Sous ces intensités lumineuses élevées l'absorption de la lumière peut dépasser la capacité d'assimilation du CO₂, particulièrement en cas d'extrême de température.

Dans cette situation le métabolisme de la photosynthèse ne suffit pas pour drainer l'énergie produite par l'absorption de la lumière. La probabilité est alors élevée d'arriver à un état de réduction important du pool de plastoquinones, qui peut servir à démarrer une cascade de signalisations induisant l'acclimatation (Huner et al. 1998 ; Pfannschmidt 2003 ; Walters 2005), mais surtout induire un état de photoinhibition.

Les mécanismes de la photosynthèse et de la photoinhibition seront décrits plus précisément dans les parties suivantes.

d. Rayonnement UV

- Le rayonnement UV est décomposé en UV-A (400 - 315 nm), UV-B (315 – 280 nm) et UV-C (280 – 153 nm). Les UV-C sont totalement absorbés par l’ozone, et n’atteignent pas la surface de la Terre.

Alors que la radiation totale augmente avec l’altitude, l’irradiance à des petites longueurs d’ondes (UV) devient importante (Blumthaler 1997, Reiter et al. 1982)

	700m	1800m	3000m
PAR (watt m-2)	350	368	401
	(1340 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(1408 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(1534 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
UV (watt m-2)	4.3	5.4	6.3

Table 1. Valeurs moyennes de la radiation globale et de la radiation UV, de 1975 à 1979, dans les Alpes Bavaroises, pendant les jours ensoleillés de Juin (Reiter et al. 1982 in Barry 2008).

- Le rayonnement UV est connu pour causer des dommages importants au niveau du photosystème II (Takahashi, 2010). Dans des conditions naturelles, il été observé que les radiations UV-B ont principalement un effet inhibitoire sur la croissance des plantes, qui corrèle avec une expansion réduite de la feuille (Caldwell 2007). Cette inhibition de la croissance de la feuille pourrait résulter de l’accumulation des dommages causés par les UV-B sur des macromolécules ou structures cellulaires, via la formation d’espèces réactives de l’oxygène (ROS).

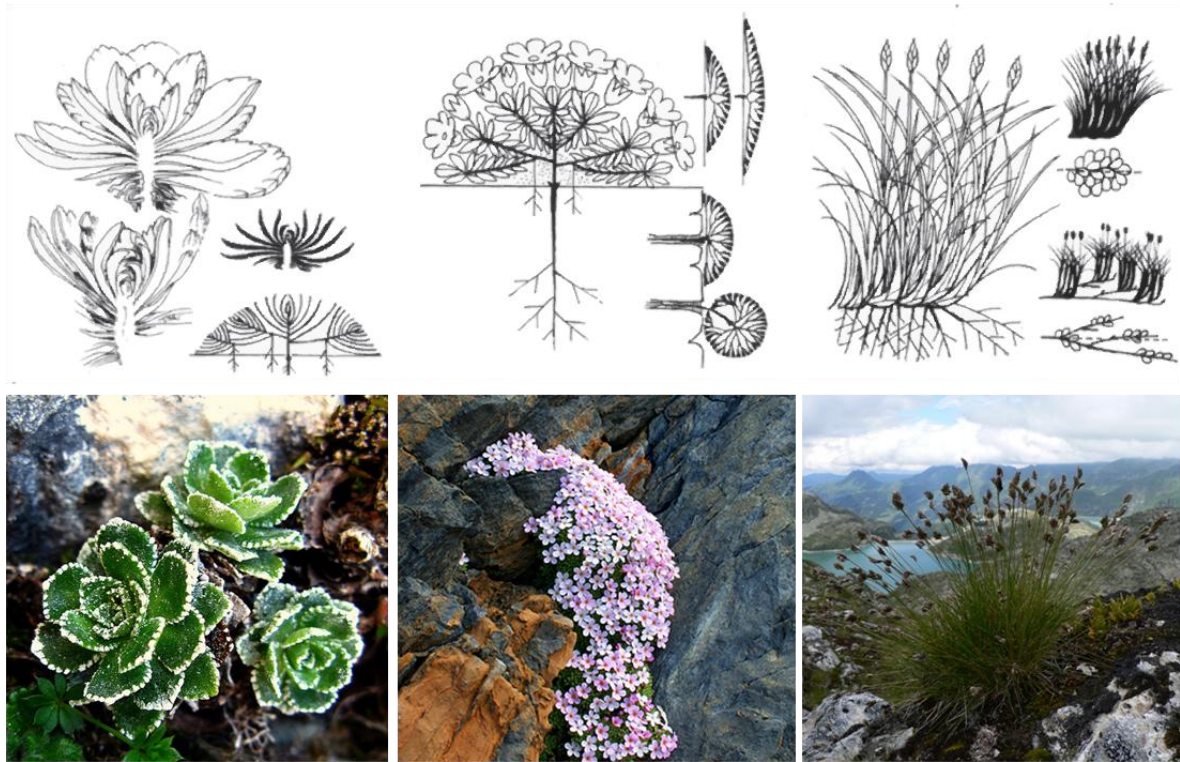
Aujourd’hui, la perception des UV-B par la plante est mal comprise : la nature du photorécepteur primaire des UV-B n’est toujours pas bien définie. Il existe cependant des éléments permettant de penser qu’il existe des récepteurs spécifiques aux UV-B, analogues aux récepteurs existants pour les radiations dans le visible et l’infra rouge (phytochromes, cryptochromes et phototropines) (Ulm et Nagy 2005).

e. Adaptations générales des plantes alpines.

Face à ces conditions climatiques contraignantes les plantes alpines présentent des adaptations morphologiques et une grande flexibilité développementale, autant en termes de croissance que de reproduction.

De nombreuses espèces associent reproduction sexuée et clonale (Cas de *Geum reptans*). La reproduction végétative peut se faire via des stolons, des rhizomes ou par multiplication des rosettes. La reproduction sexuée peut être optimisée par la formation des bourgeons floraux un ou deux ans à l'avance (cas de la Renoncule des glaciers), ou par une augmentation de la durée de floraison. Très peu d'espèces annuelles (thérophytes) sont présentes.

A partir de l'étage alpin, les petites tailles sont la norme. De nombreuses plantes présentent une forme de rosette ou de boule (dite « en coussin »), permettant de garder la chaleur à l'intérieur de la plante. En effet, la chaleur produite à l'intérieur (par exemple par la respiration, les activités enzymatiques, la photosynthèse) est moins rapidement perdue, car réabsorbée par les feuilles avoisinantes et la plante est aussi mieux protégée des effets du vent. Les graminées prennent l'apparence de touffes (tussocks) (Körner, 2003).



(Fig.7) Illustration (Reisigl & Keller 1987) des formes caractéristiques des plantes alpines : en rosette pour *Saxifraga paniculata*, en coussin pour *Androsace alpina*, et en tussock pour *Oreochloa disticha*.

Une pilosité très développée permet d'isoler les parties vitales de la plante, mais aussi de constituer un écran qui réfléchit une partie du rayonnement solaire, tout en protégeant la plante de la déshydratation causée par des vents forts.



(Fig.8) De gauche à droite. La pilosité très importante sur les feuilles d'*Adenostyles leucophylla* (Asteraceae) permet de limiter les effets néfastes des trop fortes lumières et des faibles températures sur les jeunes feuilles. Le nanisme, l'organisation de la plante en coussin et la teinte argentée des feuilles chez *Helichrysum milfordiae* (Asteraceae) (Origine Lesotho), mais aussi l'épaisseur des feuilles chez *Sempervivum arachnoidum* L. (Crassulaceae), ainsi que la coloration par les anthocyanes sont caractéristiques à l'étage alpin.

f. niches climatiques particulières

La biodiversité est importante à l'étage alpin (4% des espèces de plantes totales sur 3% de la surface terrestre) (Körner 2003) suggérant que ce milieu est plutôt favorable. Mais au delà de ces prairies à forte biodiversité, certaines espèces se trouvant à la limite de la distribution des plantes supérieures ou dans des niches climatiques, comme *Ranunculus glacialis* et *Soldanella alpina*, doivent terminer leur cycle de vie en étant régulièrement exposées à conditions climatiques extrêmes et très variables (Laureau et al. 2011).

A partir de 2000 mètres dans les Alpes, les conditions climatiques devenant plus extrêmes avec l'altitude, on trouve moins d'espèces : au fur et à mesure de l'écotone alpin-nival, la richesse spécifique diminue de plus de 200 espèces dans la zone alpine à 30-40 espèces dans la zone nivale.

Seulement une douzaine d'espèces se retrouvent au dessus de 4000 mètres d'altitude. A cette altitude, on trouve des individus isolés dans des micro-habitats où le régime thermique est probablement assez proche de celui trouvé quelques centaines de mètres

plus bas (Körner 2003). Parmi ces plantes vasculaires que l'on retrouve le plus haut dans les Alpes, on peut citer *Ranunculus glacialis*, avec quelques saxifrages comme *Saxifraga biflora*, *S. bryoides*, *S. moschata*, *S. oppositifolia* et des espèces appartenant aux genres Androsace, Gentiana, Achillea et Draba (Körner 2003).

Aux altitudes les plus élevées, les éboulis sont fréquents, caractérisés par une mobilité importante et une forte pente. On y trouve des espèces qui se sont adaptées grâce à un développement important des tiges souterraines ou rhizomes (*Ranunculus glacialis*), ou de stolons, ou tiges aériennes rampantes (*Geum reptans*, espèce pour laquelle un éboulement est source de multiplication des individus). Ces éboulis conservent une certaine humidité en profondeur.



(Fig.9) *Eboulis schisteux au dessus du Col du Galibier, à 2700 mètres environ. Les communautés de Ranunculus glacialis sont importantes dans ce milieu (on peut les distinguer autour de la centrale d'acquisition en bas à gauche de la photo), alors que très peu d'espèces y survivent (Photo prise le 26.06.2011).*

A des altitudes plus basses, dans des combes à neige, la saison de croissance est tout aussi courte : dans ces creux, un manteau neigeux important peut accumuler pendant l'hiver, et fondre avec 1 à 2 mois de retard par rapport aux zones alentours. Ces micro-habitats sont colonisés par des espèces qui tolèrent les contraintes de la floraison tardive, où croissance

et reproduction ont lieu sous des températures plus basses, dans un environnement humide et relativement froid, dans des conditions de jour raccourcis. Ce type de micro-habitat est caractéristique du milieu de croissance de *Soldanella alpina*.



(Fig.10) Combe à neige en dessous du Col du Galibier, à 2400 mètres environ. Les communautés de *Soldanella alpina* sont importantes dans ce milieu. La neige y fond plus tardivement que sur les zones alentours (Photo de gauche prise le 23.06.2011). A la fonte de la neige, les Soldanelles, qui ont gardé leurs feuilles vertes l'hiver, sont très exposées aux variations du climat, n'étant pas protégées par une végétation environnante (Photo de droite, 26.06.2006).



(Fig.11) Parmi la dizaine d'espèces qui parviennent à survivre au dessus de 4000 mètres d'altitude dans les Alpes, (1. *Saxifraga bryoïdes*, 2. *Saxifraga moschata*, 3. *Saxifraga biflora*, 4. *Saxifraga muscoïdes*, 5. *Draba fladnizensis*, 6. *Gentiana brachyphylla*, 7. *Androsace alpina*, 8. *Linaria alpina*, 9. *Phyteuma pedemontanum*, 10. *Ranunculus glacialis*), huit présentent une forme de coussinet. *R. glacialis* ne présente aucune des adaptations morphologiques décrites précédemment. (Photo SAJF, sauf *S. muscoïdes*, Juan Sanchez).

Ranunculus glacialis, comme *Soldanella alpina*, ne présente pas d'adaptation morphologique particulière à son milieu de vie. Ces deux espèces, *Ranunculus glacialis* notamment, ont attiré depuis longtemps l'attention des physiologistes : alors que très peu d'espèces sont capables de survivre aux conditions offertes par les éboulis schisteux de haute altitude ou les combes à neige, il a été supposé que celles-ci possèdent des mécanismes d'acclimatation physiologique particuliers.

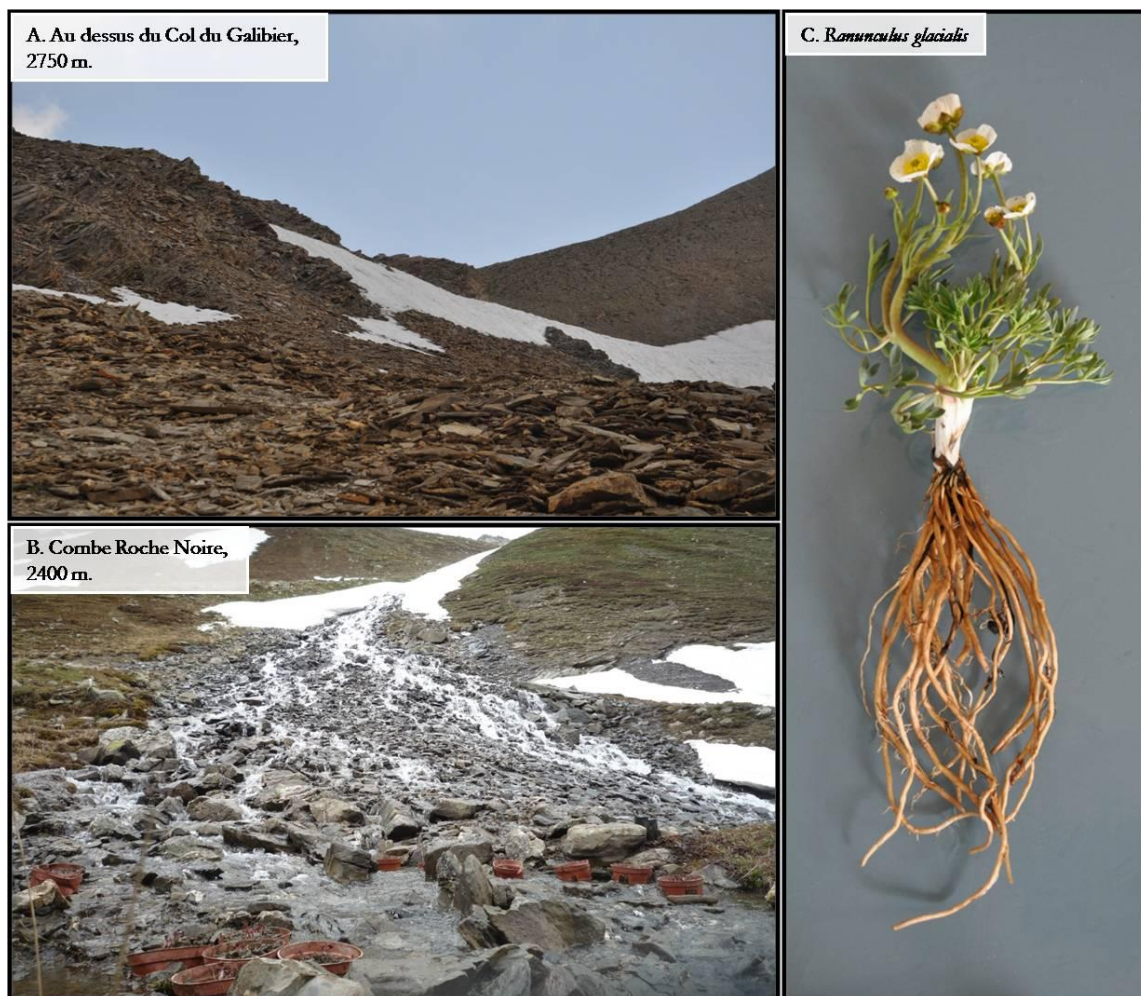
g. *Ranunculus glacialis* L. (Ranunculaceae)

Ranunculus glacialis est une plante herbacée pérenne, généralement inféodée aux éboulis siliceux (Schönswetter, 2004), qui montre une distribution arctico-alpine : on la retrouve des montagnes européennes aux régions arctiques, jusqu'au 78° Nord (Larcher 1997).

Dans les Alpes, cette espèce pionnière est très commune et abondante, capable de pousser dans des pierriers ou des moraines. Elle est largement distribuée entre 2400 et 3200 mètres, des hauts étages alpins siliceux jusqu'à des communautés sub-nivales.

Sous des micro-habitats favorables l'espèce monte jusqu'à 4000 mètres : la localité la plus haute dans les Alpes Suisses est enregistrée à 4275 mètres (Zimmermann 1975). Cette renoncule est particulièrement bien adaptée aux conditions extrêmes que l'on trouve à ces altitudes : Jarvinen (1989) décrit des plantes capables de survivre jusqu'à 33 mois complètement recouvertes par la neige (45 mois ont été létaux, selon Moser, 1970, in Jarvinen 1989).

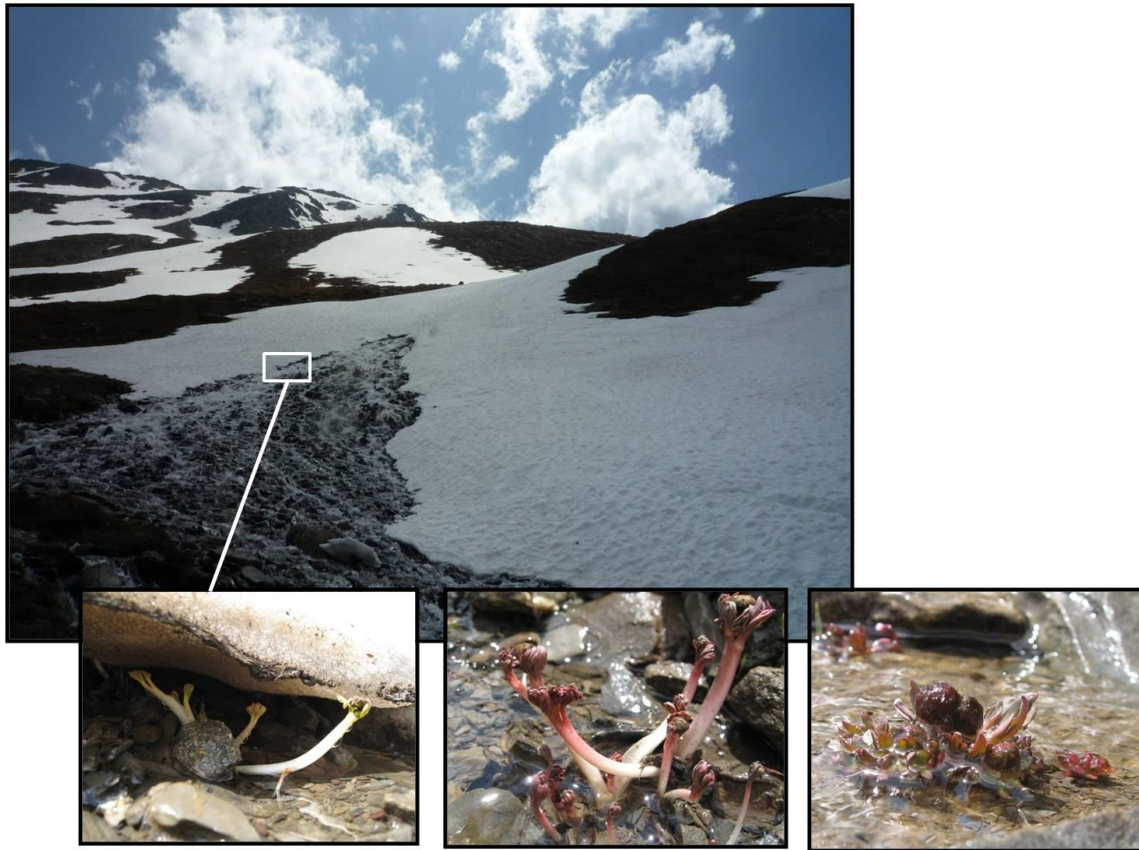
Aux plus basses altitudes de sa répartition, on la trouve dans des combes à neige, où les températures sont plus basses que dans les zones voisines, grâce au ruissellement de l'eau de fonte des neiges (3 à 4°C pers. obs.), à la forte humidité du sol et à la végétation rase, qui produisent un effet rafraichissant.



(Fig.12) A. On trouve *R. glacialis* aux plus basses altitudes (environ 2400 mètres) de sa répartition alpine dans des combes à neige, où le ruissellement des eaux de pluie dure tard dans la saison, garantissant une humidité importante du sol jusqu'à début Août (le 18 Juin 2010 à Combe Roche Noire). B. A des altitudes plus élevées, elle est très abondante dans les pierriers de schiste, où les températures sont plus basses (le 28 Juin 2011 au dessus du Col du Galibier). C. *R. glacialis* possède un système racinaire très important (Individu récolté et photographié le 23 Juin 2011)

Les pousses (ou ramettes) de la Renoncule des glaciers commencent déjà à émerger sous la neige, et la floraison a lieu généralement deux à trois semaines après la fonte de la neige (Totland 2002). Parmi les espèces de l'étage nival, *Ranunculus glacialis* présente une période de développement du système reproducteur particulièrement courte : deux semaines de préfloraison et quatre semaines de postfloraison sont suffisantes, tandis ce que *Saxifraga bryoides* et *S. mochata* ont besoin de 12 semaines pour achever leur cycle reproducteur, et *Androsace alpina* 10 à 12 semaines. La durée de ce cycle peut être

allongée aux plus hautes altitudes, alors que les conditions climatiques deviennent très contraignantes.



(Fig.13) Des ramettes étiolées de Ranunculus glacialis sont présentes sous des couches de neige de 20 à 30 cm environ. Ainsi, la mise en place de la partie aérienne se fait avant la fonte de la neige chez cette espèce. Cette fonte peut survenir rapidement, exposant à de fortes intensités lumineuses des plantes qui sont très peu pigmentées. Les fleurs peuvent être déjà en place à la fonte de la neige, le bourgeon floral étant en place deux ans avant la sortie de la fleur (Reisigl et Keller 1987).

Les plantes voisines les unes des autres sont parfois connectées à un système racinaire commun par des rhizomes courts, plus ou moins verticaux. Une plante (ramette) porte une à six ou sept fleurs, en fonction de sa taille. Les fleurs sont blanches, actinomorphes (symétrie radiale), en forme de bol, et contiennent environ 110 à 170 carpelles qui peuvent devenir des akènes après fertilisation.

Les pollinisateurs principaux de *Ranunculus glacialis* sont des diptères des familles Muscidae et Syrphidae chez qui le transport du pollen n'est pas très efficace. Cependant, la fréquence élevée des visites d'insectes durant les beaux jours et une longévité prolongée des fleurs peut palier à ce défaut.

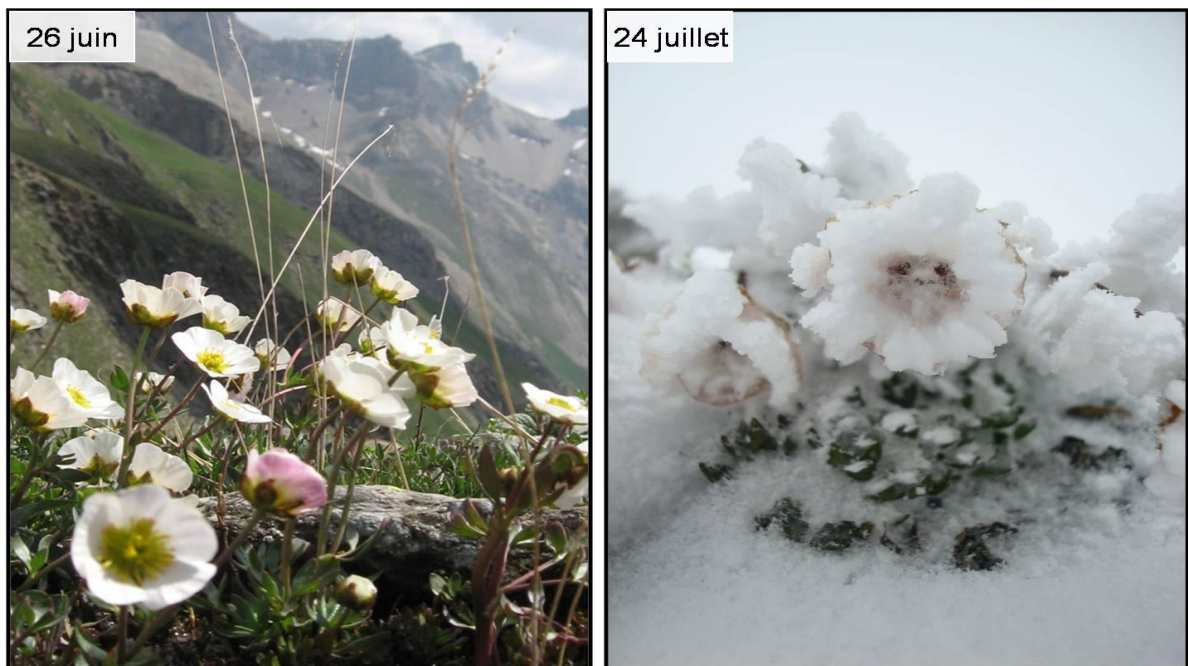
Les akènes sont libérés du réceptacle à un stade précoce, alors que le péricarpe et le tégument sont encore verts. Ces tissus photosynthétiquement actifs permettent à la maturation de la graine d'avoir lieu indépendamment de la plante mère. Les akènes en phase de maturation sont protégés par un périanthe en forme de bol qui peut être considéré comme une adaptation aux conditions difficiles sous des climats froids. La graine paraît être dormante et nécessite une longue maturation pour pouvoir germer. Il est possible que l'embryon préliminaire soit dormant pendant l'hiver, et subisse un développement plus avancé lors de la saison de croissance suivante, afin d'être prêt à germer à la deuxième année après sa dispersion.



(Fig.14) Échantillonnage représentatif de toutes les tailles de plantules présentes dans une même « touffe » de *R. glacialis*. Les racines sont profondément intriquées les unes dans les autres

Etant donné que cette espèce montre une grande longévité (27 ans de demie-vie pour des individus établis, Jarvinen 1989), la production importante de graines ne semble pas être primordiale pour le maintien des populations. Avec un nombre d'individu et une biomasse stables, les communautés peuvent traverser des courtes périodes de conditions défavorables : les individus plus âgés et plus gros sont moins vulnérables que les jeunes (Wager 1938, Dickenmann 1982, Callaghan and Emanuelsson 1985 in Jarvinen 1989).

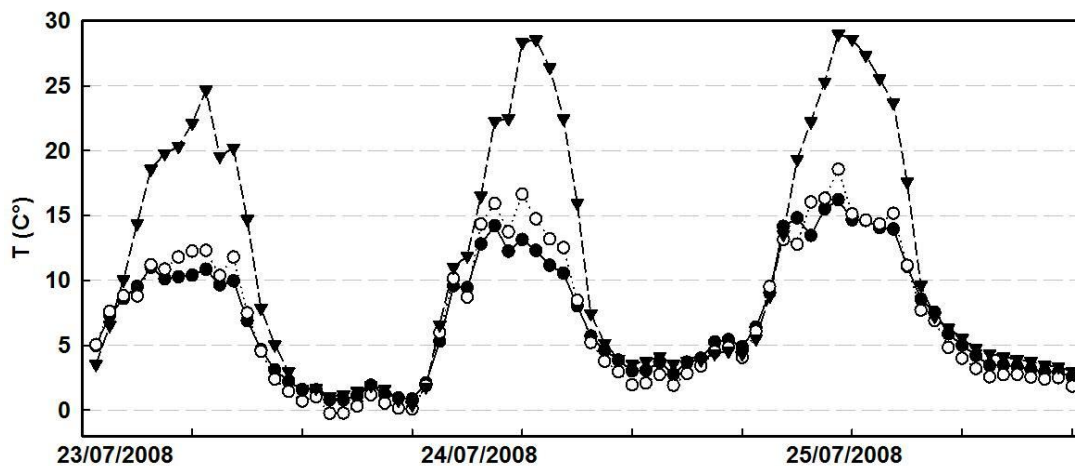
Différentes études montrent que *Ranunculus glacialis* est très bien adaptée à des températures particulièrement basses pendant sa période de croissance : elle supporte les conditions thermiques les plus basses de Juillet (7,3°C en moyenne). Sa croissance est plutôt insensible à des températures continuellement basses, du moment que les tissus ne gèlent pas (les dommages causés par le gel sont perceptibles entre -6°C et -8°C durant la période de croissance (Laureau et al. 2011)).



(Fig.15) Des évènements climatiques extrêmes ont lieu pendant la saison de croissance des plantes. Chaque année, des chutes brutales de températures ont lieu accompagnées parfois de vents importants. 26 juin 2006, 2400m, 24 juillet 2011, 2700m (F. Boucher)

Cette adaptation au froid est aussi mise en évidence par la forte sensibilité de cette espèce à la chaleur (Larcher et al. 1997). Lors d'évènements de températures élevées, cette

espèce est d'ailleurs capable de maintenir sa température foliaire plus basse que celle de l'air.



(Fig.16) Exemple de l'écart entre la température de l'air (▼) et la température des feuilles (○) et (●) chez *R. glacialis*, à l'étage alpin, à 2400m. Ces valeurs de température sont enregistrées toutes les 30 secondes, sont montrées ici les valeurs moyennes pour chaque heure de la journée.

Selon Diemer et Körner (1996), *Ranunculus glacialis* a besoin de plus de trente jours d'assimilation du CO₂ pour amortir l'investissement nécessaire à la mise en place de ses feuilles. Il est donc nécessaire pour cette espèce de posséder des mécanismes d'assimilation du CO₂ très performants, afin d'accumuler suffisamment de réserves permettant 1) l'achèvement de son cycle de vie, 2) la survie à l'hiver et 3) la mise en place des feuilles l'été.

A cause des adaptations morphologiques, limitant les effets néfastes du froid et des fortes lumières au niveau de la feuille, inexistantes chez cette espèce, on peut supposer que *Ranunculus glacialis* est plus acclimatée au niveau physiologique que les autres espèces de plantes supérieures alpines et nivales.

Ranunculus glacialis est en compétition pour le statut de plante supérieure poussant le plus haut dans les Alpes avec *Saxifraga biflora* (4490 mètres) et *Saxifraga oppositifolia* (4500 mètres) : le goût de cette espèce pour les environnements hostiles intéresse depuis longtemps les physiologistes. En 1940, Cartellieri a mesuré les taux d'assimilation du CO₂ chez différentes espèces, au long de la journée et de l'année, sous un ciel dégagé : c'est chez *Ranunculus glacialis* que ces taux sont les plus élevés et elle présente aussi une

assimilation du CO₂ à 0°C. Wager, en 1941, publie une étude de la relation entre respiration, assimilation du CO₂, et température.

h. Soldanella alpina

Soldanella alpina est abondante à des altitudes relativement basses (1500 – 2000 mètres) par rapport à *Ranunculus glacialis* et est une espèce caractéristique des combes à neige.

Cette espèce a la particularité de passer les longues périodes d'enneigement hivernal en conservant ses feuilles vertes. A la fin du printemps, lors de la fonte de la neige, ces feuilles vertes sont encore à de très basses températures (Streb et Cornic 2012) et peuvent être irradiées par de très fortes intensités lumineuses (2000 à 3000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ainsi, les conditions environnementales que la plante subit pendant les quelques heures qui suivent la fonte de la neige, mais aussi pendant la période qui précèdent l'apparition de la végétation avoisinante, sont particulièrement contraignantes pour le métabolisme photosynthétique.

A mesure que la végétation se développe autour des Soldanelles, celles-ci se trouvent dans un environnement principalement ombragé pour la majorité de leur saison de croissance et peuvent subir des températures très élevées.



(Fig.17) Le rhizome de la Soldanelle alpine conserve les cicatrices, facilement identifiables, des tiges foliaires et florales des années précédentes. Il est aussi relativement facile de repérer les marques de l'apparition d'une ou plusieurs plantes filles sur le rhizome. Ces observations permettent de voir que la plante fleurit généralement tous les 2 ou 3 ans, et qu'elle peut vivre plus d'une vingtaine d'années.



(Fig.18) La floraison et la mise en place des nouvelles feuilles a lieu lorsque la plante est encore recouverte par la neige, et les feuilles adultes peuvent rester en place jusqu'à trois ans (Streb et al. non publié).

Malgré une adaptation du mode de reproduction de l'espèce à l'environnement alpin, et particulièrement aux combes à neige, les fines feuilles de la *Soldanella alpina* ne présentent pas d'adaptation morphologique particulière. Plaquée au sol, quand elle n'est pas encore recouverte par la végétation environnante, la collerette de feuilles subit les écarts de température et les pics d'irradiance sans aucune protection.

Bien que la Soldanelle passe la majorité de la saison de croissance recouverte et isolée par la végétation environnante, elle est très exposée aux variations du climat pendant plusieurs jours au début de la saison de croissance, entre la fonte de la neige et l'apparition des plantes environnantes.

Pour chacune de ces espèces, il est essentiel de pouvoir accumuler suffisamment d'énergie (donc assimiler suffisamment de CO_2) pour assurer la formation des graines. Mais il est surtout important d'accumuler suffisamment de réserves pour assurer la survie de la plante tout au long des mois d'hiver (sous forme de bulbe, pour *Ranunculus*

glacialis, et sous forme de plante entière, pour *Soldanella alpina*), et la mise en place des fleurs dès la fonte de la neige.

L'efficacité de la photosynthèse est primordiale pour ces espèces qui subissent des extrêmes climatiques et un raccourcissement important de la durée de leur saison de croissance. Les dommages causés par ces contraintes climatiques au niveau du processus de la photosynthèse peuvent être limités par des adaptations morphologiques (citées dans ce chapitre), mais aussi par des mécanismes physiologiques.

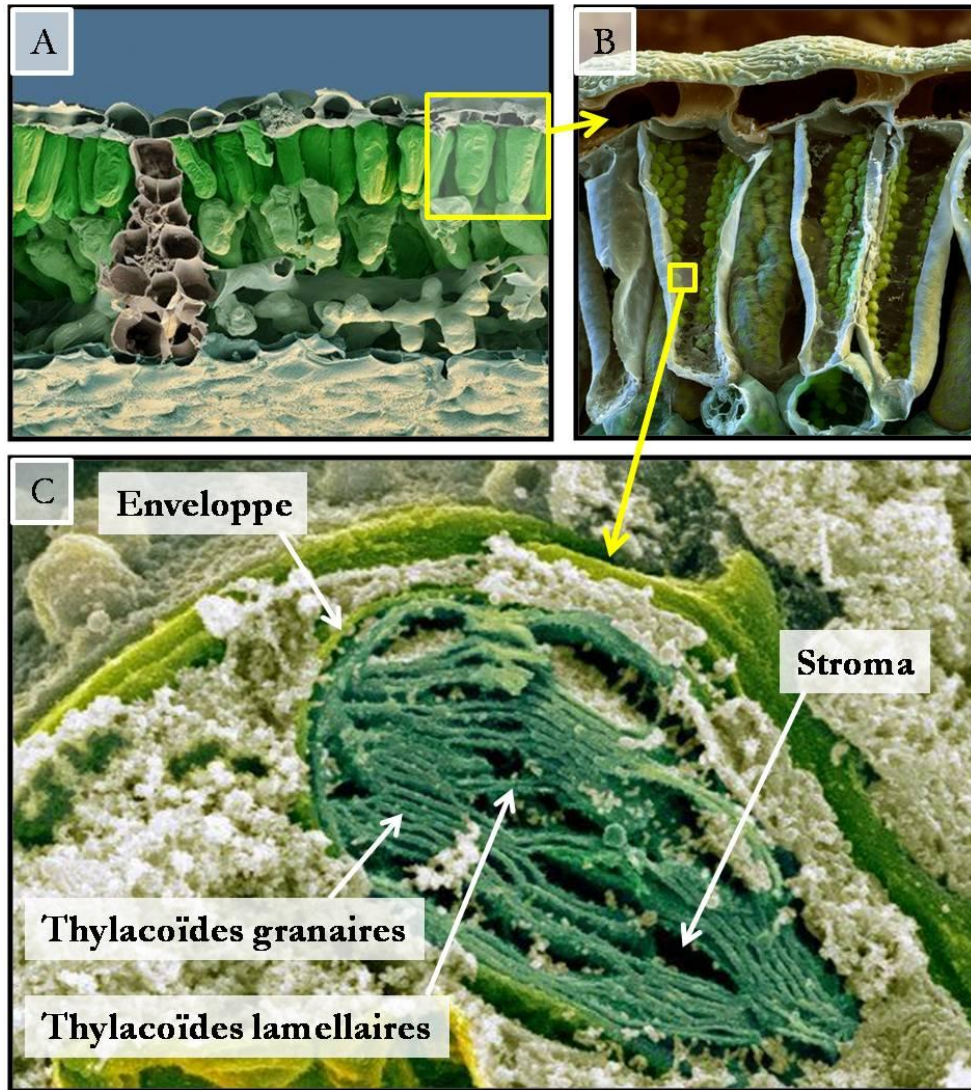
Certains de ces processus physiologiques sont l'objet de cette étude.

1.2 Le chloroplaste et la photosynthèse

1.2.1 Organisation des chloroplastes

Les organismes photosynthétiques sont caractérisés par leur capacité à utiliser l'énergie lumineuse, le CO₂, l'eau et les sels minéraux pour synthétiser de la matière organique, essentielle à notre vie sur terre. Cette production d'énergie, essentielle pour tous les organismes non autotrophes, est rendue possible par le mécanisme de la photosynthèse.

Le processus biochimique de la photosynthèse se déroule dans le chloroplaste. Cet organite spécialisé est entouré d'une enveloppe : une membrane externe perméable aux métabolites de petite taille, et une membrane interne délimitant le stroma, milieu gélatineux composant une matrice intra-chloroplastique.



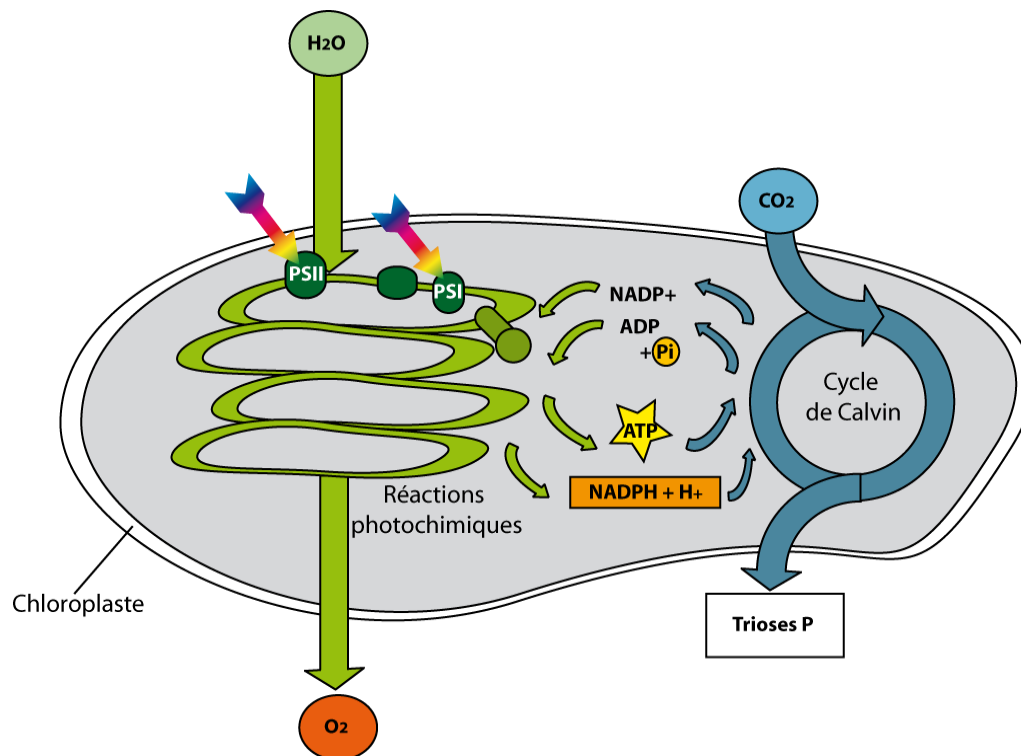
(Fig.19) Coupe transversale dans une feuille de soja (*Glycine max*, L.) (x200), (B) détail de la coupe transversale d'une feuille d'Ellébore noir (*Helleborus niger*, L.) (x750) et (C) détail de la coupe transversale d'une cellule végétale montrant un chloroplaste (x8000), par microscopie électronique à balayage, mise en couleur artificielle (SciencePhotoLibrary).

(A) Structure de la feuille : l'épiderme (couche supérieure) est composé de cellules rondes, le parenchyme palissadique contient des cellules verticales, allongées et serrées, et le parenchyme lacuneux contient des cellules rondes et espacées : les lacunes servent à la circulation des gaz échangés avec l'atmosphère. L'épiderme inférieur est ponctué de stomates, permettant les échanges de gaz avec l'atmosphère. A gauche du centre sont situés les vaisseaux du phloème et xylème, qui assurent le transport de l'eau, nutriments et hormones dans toute la plante.

(B) Les cellules allongées du parenchyme palissadique contiennent des chloroplastes.

(C) Le chloroplaste, site de la photosynthèse, est entouré d'une enveloppe et contient des thylacoïdes.

La photosynthèse permet la conversion du CO₂ atmosphérique en carbone organique selon le bilan suivant : $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$, et ce phénomène est souvent décrit sous forme de deux phases, ou réactions : primaire et secondaire.



(Fig.20) Représentation schématique des processus photosynthétiques au sein du chloroplaste. La phase primaire (réactions photochimiques) a lieu dans les membranes des thylacoïdes et la phase secondaire (cycle de Calvin) a lieu dans le stroma. PSII : photosystème II, PSI : photosystème I.

La première phase, appelée réaction primaire ou photochimique, a lieu dans les membranes des thylacoïdes et correspond à la capture de l'énergie lumineuse et à sa conversion, sous forme d'ATP (plus précisément de la liaison phosphoanhydre contenue dans l'ATP) et de pouvoir réducteur (par la réduction de NADP⁺ en NADPH), en énergie chimique.

Les thylacoïdes sont décrits comme une structure membranaire composée d'empilements de petites vésicules aplaties (thylacoïdes granaires, ou du grana) et de lamelles reliant ces empilements (thylacoïdes lamellaires, ou du stroma). Ces membranes contiennent tous les

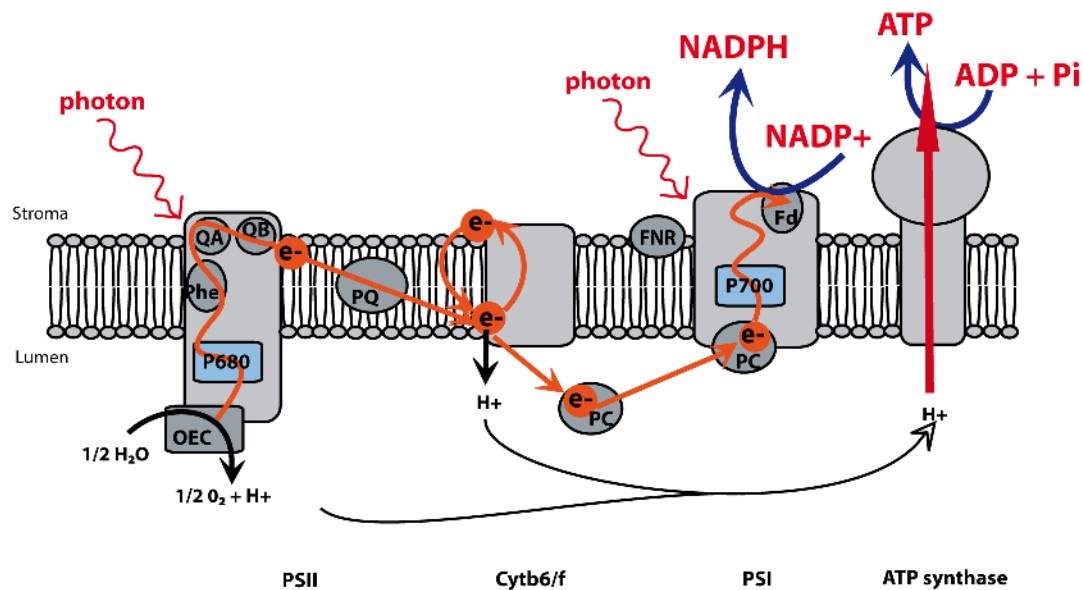
éléments de la machinerie photosynthétique : pigments et antennes collectrices pour la capture de la lumière, complexes enzymatiques pour sa conversion en énergie chimique.

La seconde phase, appelée réaction secondaire ou non photochimique, correspond aux fonctions métaboliques qui ne sont pas directement dépendantes de la lumière. Ainsi, la fixation du CO₂ atmosphérique et sa transformation en carbone organique au cours du cycle de Calvin sont des étapes qui ont lieu dans le stroma du chloroplaste. Cette conversion utilise l'énergie chimique contenue dans l'ATP et le NADPH. C'est aussi dans le stroma que prennent place les activités de transcription et traduction du matériel génétique du plaste.

1.2.2 Réactions primaires

a. Absorption de l'énergie lumineuse, transfert linéaire d'électrons

Dans les membranes des thylacoïdes, des chlorophylles et caroténoïdes sont organisées en antennes collectrices (LHC, Light Harvesting Complex), mais on retrouve aussi des molécules de chlorophylle a dans les centres réactionnels et des caroténoïdes dans les membranes. Ces pigments sont excités par l'absorption des photons et l'énergie d'excitation ainsi générée est transférée de pigment en pigment vers les centres réactionnels, P680 pour les photosystèmes II (PSII) et P700 pour les photosystèmes I (PSI).



(Fig.21) Représentation schématique du transfert linéaire d'électrons photosynthétique et de la translocation de protons. PSII : photosystème II ; Phe : phéophytine ; QA : plastoquinone A ; QB : plastoquinone B ; PSI : photosystème I ; Cytb6/f : cytochrome b6/f ; PQ ou PQH2 : pool de plastoquinones ou plastoquinols ; PC : plastocyanine ; Fd : ferrédoxine ; FNR : ferrédoxine NADP+ réductase.

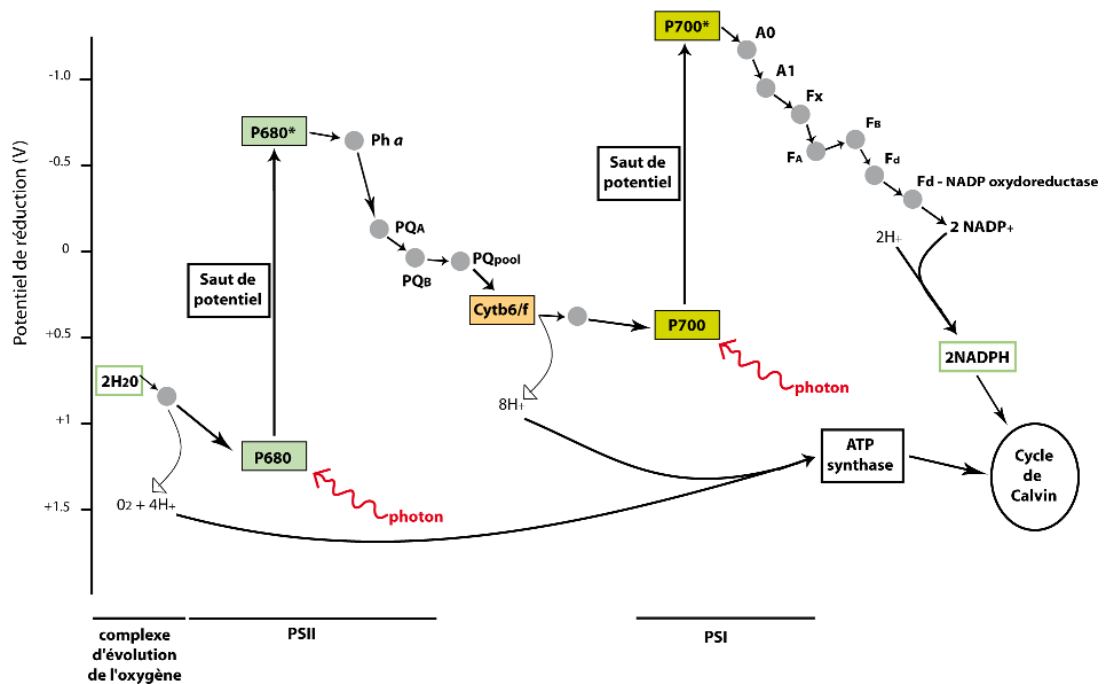
Au niveau du PSII, P680 réalise une séparation de charge par la délocalisation d'un électron originaire d'une paire de chlorophylles a (Chl a^*) vers la phéophytine (Phéo). Cet électron est ensuite transféré dans une chaîne de transporteurs membranaires, constituée de plastoquinones, successivement la plastoquinone A (QA), la plastoquinone B (QB) puis le pool des plastoquinones (PQ).

Cette séparation induisant l'accumulation de charges positives du côté donneur du PSII, le P680 se trouve sous forme oxydée et devient capable de recevoir un électron provenant d'un donneur secondaire, Z, qui est lui-même ensuite réduit par un électron provenant de l'oxydation de l'eau. Cette photolyse de l'eau génère la production d'oxygène ; en faisant le bilan de ces réactions, on voit qu'à partir de deux molécules d'eau, $4H^+$ sont libérés dans le lumen, et $4e^-$ transitent de P680 à QB. Lorsque QB a reçu deux électrons, elle lie $2H^+$ provenant du stroma, et rejoint le pool des PQ solubles dans la membrane, servant ainsi de transport de H^+ à travers la membrane des thylacoïdes (Krause et Weis 1991). Le pool de plastoquinol (PQH2) est alors lui-même oxydé par le cytochrome b6/f, permettant

la translocation de $2H^+$ vers le lumen via le cycle Q (Cramer et al. 2011). Finalement, les électrons sont pris en charge par la plastocyanine (PC), et enfin par le PSI.

Au niveau du PSI, une séparation de charge a aussi lieu, et l'électron délocalisé est transféré par la ferrédoxine, protéine soluble du stroma, entraînant l'oxydation de la plastocyanine. La réduction du $NADP^+$ est réalisée à partir de la ferrédoxine réduite, grâce à la ferrédoxine NADP réductase (FNR).

Le transfert des électrons tout au long de cette chaîne génère un gradient de H^+ , qui est utilisé par l'ATP synthase, pour produire de l'ATP.



(Fig.22) Représentation du « Schéma en Z » de la photosynthèse, détails des voies de transfert des électrons dans les photosystèmes II et I. Les transporteurs d'électrons sont représentés selon la séquence du flux d'électrons. P680 : centre réactionnel du PSII ; Ph a : phéophytine a ; PQA : plastoquinone a ; PQB : plastoquinone B ; PQpool : pool de plastoquinones ; P700 : centre réactionnel du PSI ; A0 : Chl a, donneur primaire ; A1 : phylloquinone ; Fx : centre fer-soufre ; FA : centre fer-soufre ; Fo : centre fer-soufre ; Fd : ferrédoxine.

Ce transfert d'électrons a lieu dans le sens des potentiels redox, sauf en ce qui concerne deux sauts énergétiques permis par l'apport d'énergie lumineuse, au niveau des photosystèmes I et II. Cet ensemble de réaction est généralement appelé « schéma en Z »

de la photosynthèse, ou « transfert linéaire d'électrons » par opposition à d'autres transferts, alternatifs.

b. Organisation des membranes thylacoïdiennes

La membrane des thylacoïdes est partagée entre les thylacoïdes lamellaires et les thylacoïdes granaires, qui sont empilés grâce à des liaisons inter membranaires, notamment par des cations divalents comme le Mg^{2+} et l'association des PSII.

Ces deux domaines ne présentent pas les mêmes caractéristiques biochimiques : les matrices lipidiques n'ont pas la même composition protéique et ne présentent pas la même fluidité (Ford et al. 1982, Anderson et Anderson 1980) et c'est dans les thylacoïdes granaires que l'on retrouve la plus grande partie des PSII, tandis ce que c'est dans les thylacoïdes lamellaires que l'on retrouve la plus grande partie des PSI et des ATP synthase. Le cytochrome b6/f se retrouve lui de manière plus homogène dans les deux types de thylacoïdes.

Entre le PSII et le PSI, la liaison est assurée par la diffusion latérale des PC qui sont solubles dans le lumen et dans une moindre mesure par la diffusion du pool des PQ dans la membrane.

c. Composition de la chaîne de transfert des électrons

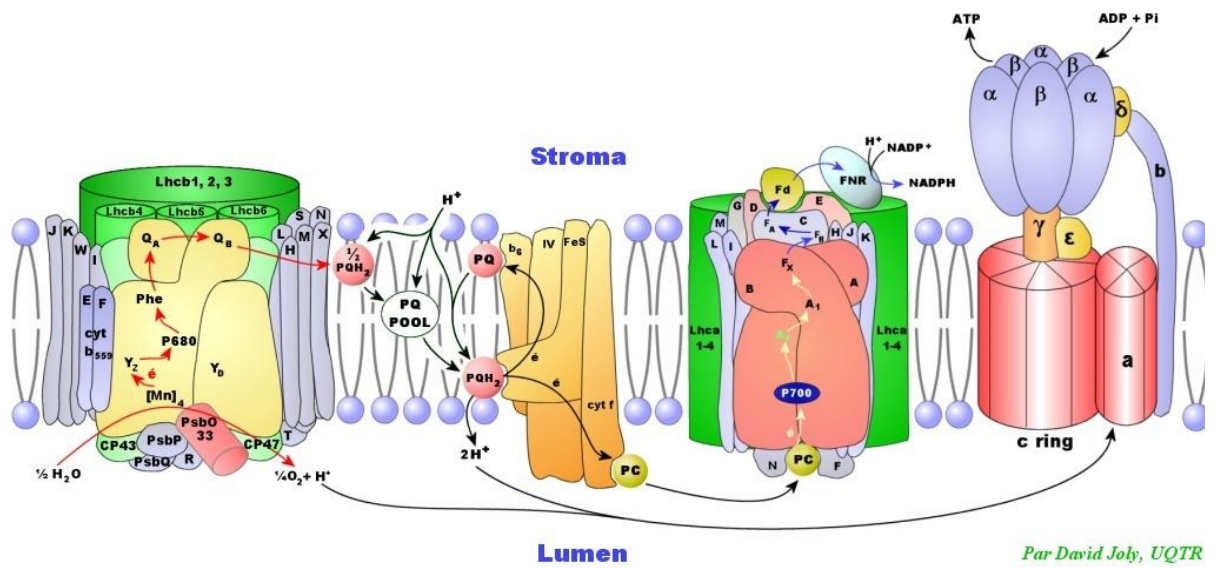
Des antennes collectrices sont associées au PSII, appelées LHC II. L'énergie d'excitation est reçue par les LHC II et transmise au centre réactionnel du PSII par des protéines antennes, CP47 et CP43.

Le centre réactionnel du PSII, P680, est constitué de Chla et de nombreuses protéines, parmi lesquelles les protéines D1 et D2 qui forment un hétérodimère contenant un résidu tyrosine. Ce résidu tyrosine sert de donneur d'électrons à la Chla du P680 oxydé. La phéophytine et la plastoquinone A (QA) sont associées aux protéines D1 et D2.

Au niveau du site QB une plastoquinone a pour rôle le transfert des électrons de QA vers le pool des plastoquinones membranaires (PQ) (environ 7 PQ par PSII), qui permet le transport d'électrons du PSII vers le cyt b6/f. Les PQ sont mobiles dans la membrane lipidique et quand une PQ est entièrement réduite en plastoquinol (ou PQH₂) en ayant accepté deux électrons, elle peut servir de donneur d'électrons au cyt b6/f, et une PQ

oxydée remplace la PQH2 au du site QB. (En acceptant un seul électron, la PQ est réduit à l'état de semi quinone PQ⁻, qui est une forme semi-radicalaire).

Au niveau du PSII, la photolyse de l'eau mets en jeu trois protéines extrinsèques, au sein du complexe d'évolution de l'oxygène (OEC), codées par les gènes psbO, psbP et psbQ, ainsi que des cofacteurs inorganiques tels que le manganèse, le calcium, et le chlore (Renger 1992).



(Fig.23) Représentation schématique des différentes sous unités des complexes impliqués dans la chaîne de transfert des électrons photosynthétique, dans les membranes des thylacoïdes.

Au niveau du complexe cytochrome b6/f (cytb6/f), sont présents quatre centres redox qui sont liés par quatre protéines, la protéine de Rieske (protéine à centre fer-soufre), le cytochrome f, le cytochrome b6 et la sous unité IV. L'oxydation des PQH2 a lieu au niveau du site Q0 et elle est associée à la réduction du centre fer-soufre de la protéine de Rieske (Cramer et al. 1996). C'est la réduction de l'hème de cytochrome f (hème C) par la protéine de Rieske qui permet de transférer des électrons vers la plastocyanine. A l'oxydation des PQH2 au niveau du site Q0, on associe aussi la réduction du cytochrome b, qui est impliqué dans le transfert cyclique des électrons au sein du cytochrome b6f, appelé proton moteur.

La plastocyanine, PC, protéine mobile dans le lumen, contient un atome de cuivre. Alors qu'elle est réduite par le cytb6/f, elle réduit à son tour le centre réactionnel du PSI (P700+).

Le centre réactionnel du PSI, associé à des antennes collectrices LHC I, contient protéines (dont les protéines majeures Psa A et Psa B) et Chl *a*, ainsi que trois protéines à centres fer soufre, Fx et FA/FB formant les premiers accepteurs stables du PSI. L'association protéines-pigments des antennes LHC I représentent seulement 5 à 10% des pigments membranaires de thylacoïdes.

La ferrédoxine est constituée d'un centre fer-soufre bi nucléaire et la FNR est une protéine soluble dans l'eau, qui fait partie de la classe des flavoenzymes, classe de protéines utilisant une FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), liée de façon non covalente, comme centre d'oxydoréduction.

Dans les photosystèmes, on retrouve la chlorophylle sous forme *a* et *b* (qui diffèrent par la présence d'un groupe aldéhyde-CHO pour la Chl *a*, ou méthyl-CH₃ pour la Chl *b*). Plusieurs centaines de Chl *a* ou Chl *b* sont associées à chaque chlorophylle centre (Chl *a**). Des caroténoïdes se trouvent au niveau des membranes, des antennes collectrices (pouvant absorber entre 420 et 530 nm, et transférer une énergie d'excitation aux chl) et des centres réactionnels.

Lorsque la Chl est excitée, elle possède trois voies de dissipation possibles : participer à la photochimie par le transfert de l'énergie à une Chl centre, retrouver son état stationnaire en réémettant son énergie sous forme de chaleur (dans la région comprise au-delà de 780 nm) ou encore retrouver son état stationnaire en réémettant son énergie sous forme de fluorescence (dans la région rouge du spectre comprise entre 680 et 730nm).

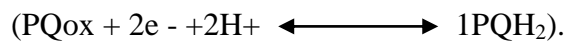
d. Génération de pouvoir réducteur, gradient de protons trans-membranaire et synthèse d'ATP

Au niveau du PSI, la réduction de la ferrédoxine par un électron provenant d'une séparation de charge permet la réduction du NADP⁺ grâce à la ferrédoxine NADP réductase (FNR). Le NADPH ainsi produit constitue un pouvoir réducteur utilisé dans les réactions secondaires de la photosynthèse.

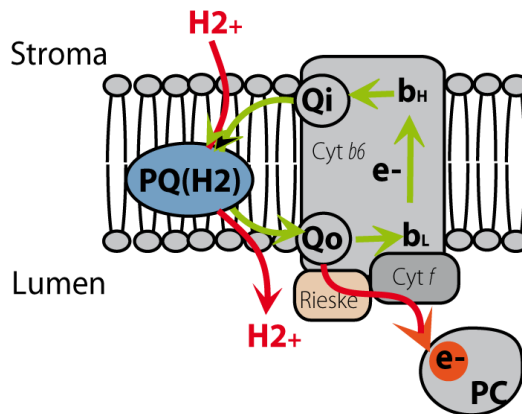
Le transfert des électrons génère un gradient transmembranaire de H⁺ au cours de la photolyse de l'eau, de la réduction des plastoquinones et du cycle Q :

Lors de la photolyse de l'eau au niveau du PSII, 2H⁺ sont libérés dans le lumen alors que 2e⁻ sont transférés (H₂O → 2e⁻, 2H⁺ et 1/2O₂).

La réduction des plastoquinones fait entrer en jeu 2H⁺ provenant du stroma qui sont libérés coté lumen lors de l'oxydation par le cyt b6/f .



Enfin, lors du cycle Q ayant lieu dans le cyt b6/f, 2H⁺ sont transportés du stroma vers le lumen.



(Fig.24) Représentation schématique du transfert cyclique des électrons, ou cycle Q, au sein du cytochrome b6/f

Ce gradient de protons transmembranaire contient une énergie appelée force protomotrice, qui est utilisée pour la synthèse de l'ATP via l'ATP synthase, un complexe protéique qui utilise d'ADP et le phosphate inorganique (Pi). Le flux de H⁺ dans l'ATP synthase permet de créer une liaison phosphoanhydride à haute énergie entre ADP et Pi. Aujourd'hui, le consensus semble être acquis sur le fait que 4 protons au moins seraient nécessaires pour la formation d'une molécule d'ATP.

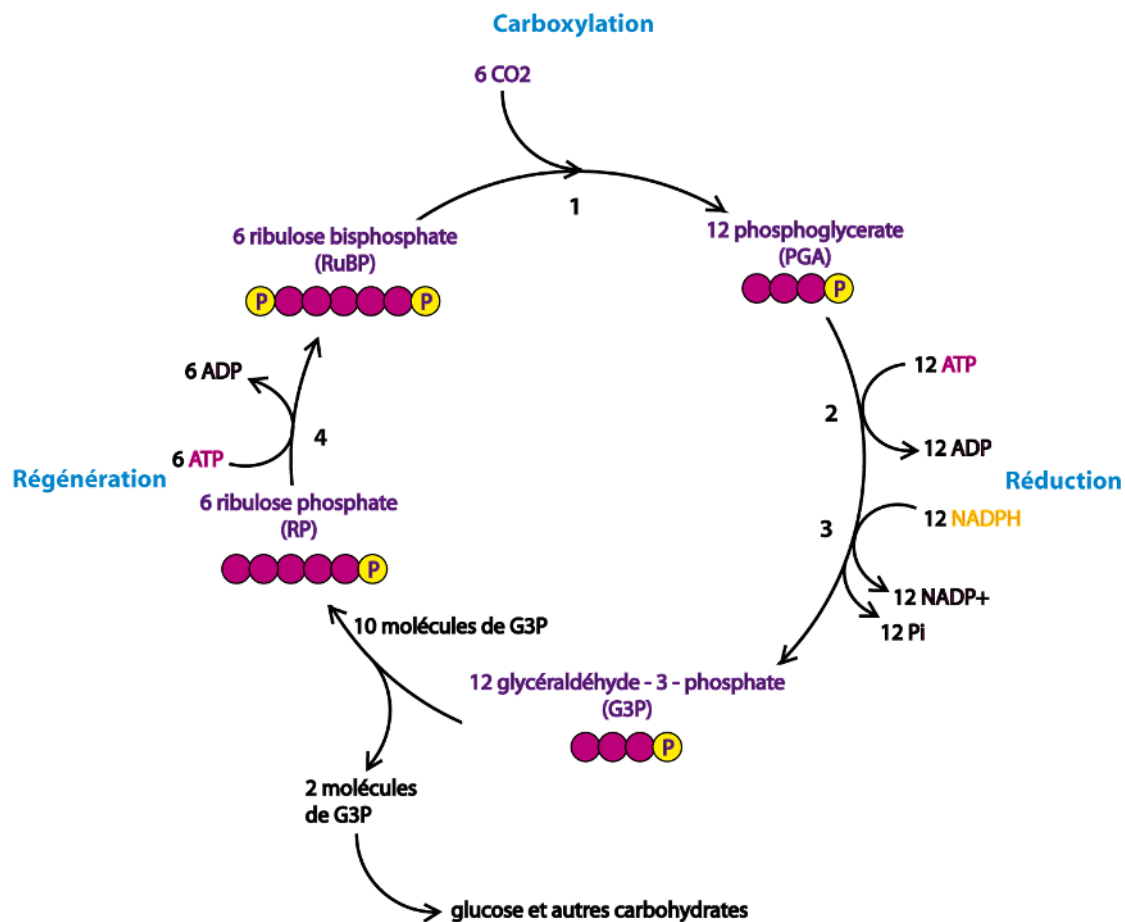
Le transfert linéaire des électrons dans la membrane des thylacoïdes (initié par l'absorption de deux photons au niveau de P680 et P700), génère une force protomotrice

via la libération de $6H^+$ dans le lumen des thylacoïdes et conduit à la production de 1,5 ATP et pour 1 NADPH.

1.2.3 Réactions secondaires

a. Assimilation photosynthétique du CO_2

Le cycle photosynthétique de réduction du carbone en carbohydrates, ou cycle de Calvin, utilise l'énergie chimique produite lors du transfert d'électrons (ATP et NADPH) et a lieu dans le stroma.



(Fig.25) Représentation du cycle de Calvin, ou cycle photosynthétique de réduction du carbone chez les plantes de type C_3 . 1 : Rubisco ; 2 : Phosphoglycérate kinase ; 3 : Glycéraldéhyde-3-phosphate- déshydrogénase ; 4 : Phosphoribulokinase.

La Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco) est la protéine la plus abondante chez les végétaux vasculaires (elle représente 40% des protéines solubles dans

la feuille) et l'enzyme clef du cycle de Calvin : elle permet la liaison du CO_2 au Ribulose 1,5bisphosphate (RuBP) et la formation de deux molécules d'acide 3 phosphoglycérique (3-PGA).

L'ATP et le NADPH permettent ensuite les réactions de phosphorylation et de réduction qui transforment le 3-PGA en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P, trioses phosphates). Ces trioses phosphates sont soit utilisés pour la synthèse d'amidon dans le chloroplaste, soit exportés vers le cytosol pour servir à la synthèse de saccharose (après isomérisation en dihydroxyacétone phosphate) soit réutilisés dans le cycle de Calvin pour la synthèse du RubP.

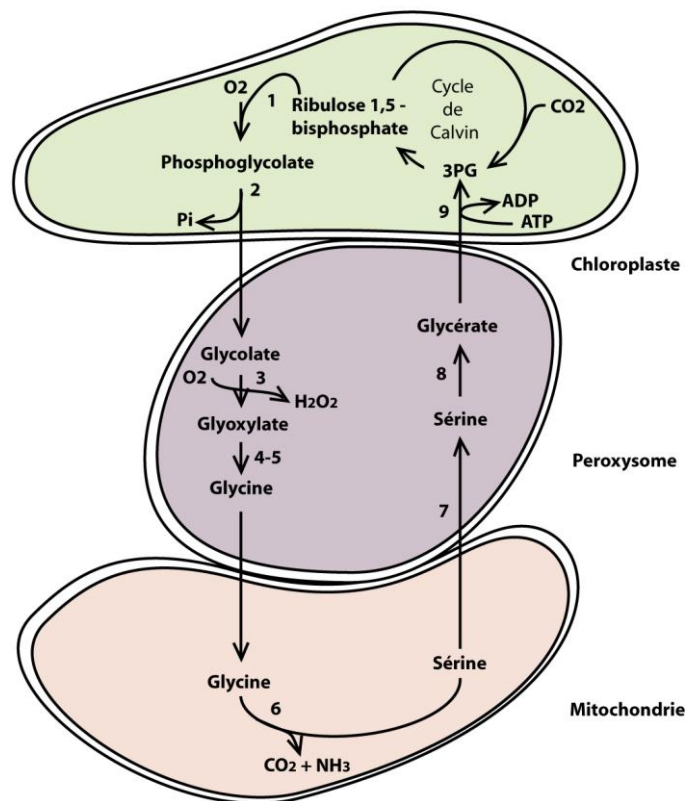
Une fraction des trioses phosphate est utilisée pour la régénération du RuBP, nécessaire pour le fonctionnement du cycle. Cette régénération est réalisée par une succession de réactions faisant intervenir des sucres à nombre variés de carbones, permettant la synthèse de trois pentoses phosphate (Ribulose phosphate) à partir de cinq trioses phosphate (G3P), les pentoses phosphate formés étant finalement phosphorylés par la phosphate ribulose kinase (PRK) pour former le RubP. Une molécule d'ATP supplémentaire est donc impliquée dans l'assimilation d'une molécule de CO_2 .

La formation d'une molécule de glucose, soit la fixation de 6 molécules de CO_2 , au cours du cycle de Calvin, nécessite l'oxydation de 12 molécules de NADPH et l'hydrolyse de 18 molécules d'ATP : le fonctionnement de ce cycle nécessite donc un rapport ATP/NADPH de 1,5 (Osmond, 1981) et 48 photons, si tout fonctionne bien.

A la lumière, lorsque la Rubisco peut fixer le CO_2 , elle possède aussi la capacité de fixer l' O_2 . Ces activités qui correspondent respectivement à la carboxylation et l'oxygénation, sont en compétition. C'est le cycle de Calvin qui est initié dans le cas d'une activité de type carboxylase et c'est le cycle de la photorespiration qui est initié dans le cas d'une activité de type oxygénase.

b. Photorespiration

Le processus de photorespiration correspond à une activité respiratoire car il implique la consommation d' O_2 et le dégagement de CO_2 . Lors de ce processus, l'oxygénation du RuBP permet la formation d'une molécule de 3-PGA et d'une molécule de phosphoglycolate.



(Fig.26) Représentation du cycle photorespiratoire, ou cycle d'oxydation du carbone photosynthétique. 1 : Rubisco, 2 : phosphoglycolate phosphatase, 3 : glycolate oxydase, 4 : sérine-glyoxylate aminotransférase, 5 : glutamate-glyoxylate aminotransférase, 6 : sérine hydroxyméthyl transférase, 7 : glutamate hydroxypyruvate aminotransférase, 8 : glycérate déshydrogénase, 9 : glycérate kinase.

Le 3-PGA est utilisé par le cycle de Calvin et le phosphoglycolate est d'abord déphosphorylé en glycolate dans le chloroplaste, puis oxydé en glyoxylate dans le peroxysome et finalement transformé en glycine par transamination, puis transporté dans la mitochondrie.

Dans la mitochondrie, une molécule de sérine, une molécule d'ammonium (NH_4^+) et une molécule de CO_2 sont formées à partir de la décarboxylation de deux glycines.

L'ammonium, toxique pour la cellule quand il s'accumule, est recyclé par le cycle GS/GOGAT (Glutamine synthase/Glutamate synthase) dans le chloroplaste, ou dans le cytoplasme.

Après sa synthèse dans la mitochondrie, la sérine est dirigée vers le peroxysome où elle est transaminée en hydroxypyruvate, puis une étape de réduction permet sa transformation en glycérate par l'hydroxypyruvate réductase.

Finalement, le glycérate est transformé en phosphoglycérate grâce à une glycérate kinase dans le chloroplaste, puis en RuBP par le cycle de Calvin.

Alors que l'affinité de la Rubisco pour l'O₂ est bien plus faible que pour le CO₂, la forte concentration en O₂ dans l'atmosphère (21%) par rapport au CO₂ (0,038%) rend la réaction de photorespiration importante chez les végétaux vasculaires. Des études montrent un taux de rejet du CO₂ par la photorespiration représentant de 25 à 50% du taux de CO₂ assimilé. Mais si la photorespiration conduit à une perte d'énergie et de carbone, elle joue un rôle important dans la physiologie de la photosynthèse en utilisant le pouvoir réducteur en excès dans des conditions où le CO₂ est limitant (fermeture stomatique en cas de sécheresse par exemple). Alors que le H₂O₂ formé dans le peroxysome est efficacement détoxifié par la catalase, le drainage du pouvoir réducteur en excès dû à la photorespiration permettrait d'éviter la formation de ROS et ainsi des dommages causés par du stress oxydatif sur l'appareil photosynthétique (Kozaki et Takeba, 1996).

Cependant, étant donné que de l'ATP est utilisé pour le recyclage de l'ammonium, la formation du 3-PGA et la transformation du 3-phosphoglycérate en RuBP, le rendement de la photosynthèse est très augmenté en absence de photorespiration (sous de faibles concentration en O₂, ou de fortes concentrations en CO₂). Dans ces conditions, la fixation d'1 molécule de CO₂ nécessite la réduction de 2 molécules de NADPH et de 3 molécules d'ATP, donc un rapport ATP/NADPH de 1,5.

Au point de compensation du CO₂, qui correspond à la concentration en CO₂ pour laquelle la réaction de consommation du CO₂ (par la carboxylation) égale les réactions de production du CO₂ (par la respiration et la photorespiration), la fixation d'une molécule de CO₂ nécessite 6 molécules de NADPH et 10 molécules d'ATP, donc un rapport ATP/NADPH de 1,66.

Selon l'activité photorespiratoire, l'assimilation du CO₂ nécessite donc un rapport ATP/NADPH compris entre 1,5 et 1,66, et le transfert linéaire d'électrons génère théoriquement un ratio autour de 1,5, si l'on considère que le cycle Q est constitutif. Le transfert linéaire d'électrons ne suffit donc pas à l'approvisionnement en énergie de la fixation photosynthétique du CO₂ (Kozaki et Tabeka 1996). Cependant, un apport en ATP pourrait provenir des flux alternatifs au flux linéaire, décrits plus loin dans ce chapitre.

Chez *Ranunculus glacialis*, l'espèce alpine présentant (parmi les plantes alpines étudiées) le taux le plus élevé de transport électronique au niveau du PSII, la photorespiration consomme la plupart des électrons qui ne sont pas consommés par l'assimilation du CO₂, et 15 à 20 μmol d'électrons m⁻² s⁻¹ sont distribués à un autre mécanisme consommant de l'O₂, à 6°C et 22°C, sous forte concentration de CO₂ (Streb et al. 2005).

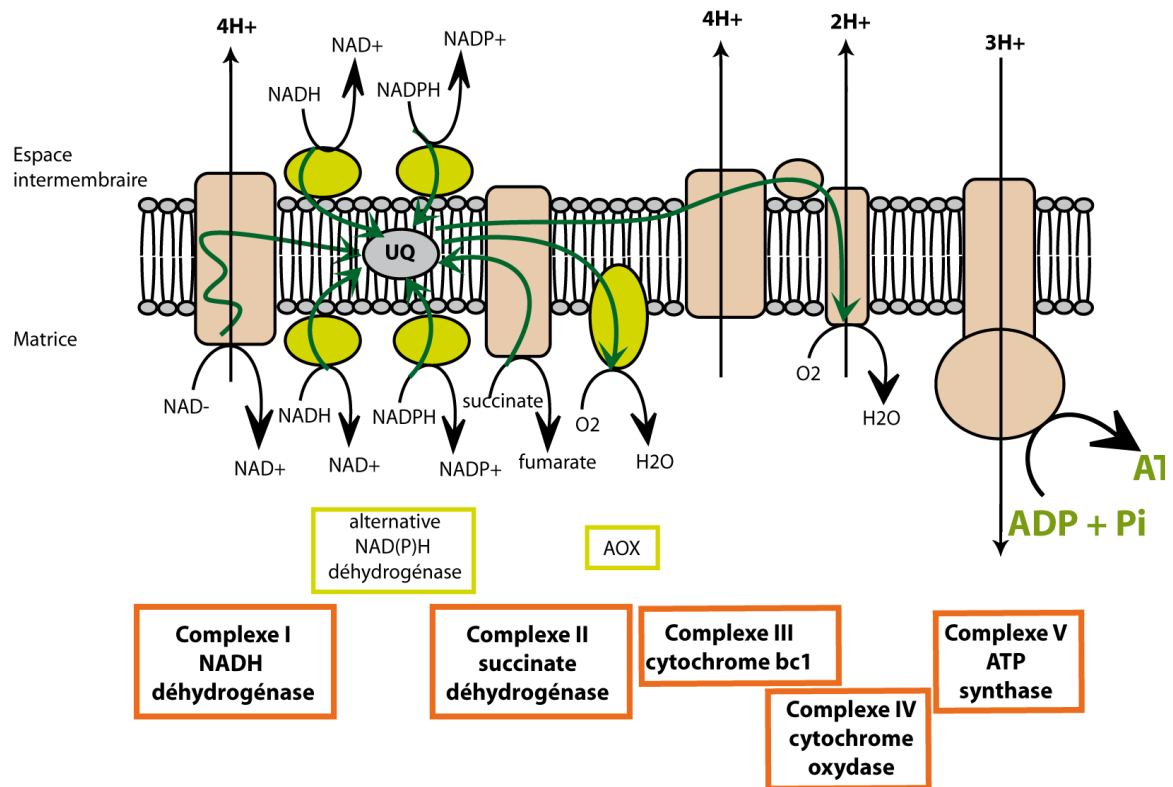
c. Respiration à l'obscurité et à la lumière

La respiration mitochondriale correspond à l'oxydation de molécules organiques en CO₂, associée à la réduction du NAD⁺ et du FAD : cet ensemble de réaction est appelé cycle de Krebs. Le pouvoir réducteur formé par ces réactions est oxydé dans une chaîne de transport électronique, qui a lieu dans la membrane interne de la mitochondrie. Divers complexes protéiques sont impliqués dans cette chaîne de transport :

La NADH deshydrogénase (ou Complexe I) assure l'oxydation du NADH,

Le cytochrome bc₁ (Complexe III) et la cytochrome c oxydase (Complexe IV) permettent l'établissement d'un gradient de proton entre la matrice et l'espace inter membranaire, qui conduit à la synthèse d'ATP.

Il existe aussi dans les mitochondries végétales des voies de transfert alternatif d'électrons, dont plusieurs NAD(P) ubiquinone réductases, qui permettent la réduction du pool des ubiquinones à partir du NADH, et une alternative oxydase (AOX) qui permet de court circuiter le transfert des électrons au pool d'ubiquinone et de les transférer à l'oxygène moléculaire.



(Fig.27) Représentation schématique du transfert d'électrons et des translocation de protons au cours de la respiration mitochondriale, dans la membrane interne de la mitochondrie, chez les plantes supérieures. Les complexes protéiques communs à tous les organismes eucaryotes sont représentés en beige, les complexes protéiques spécifiques aux végétaux sont représentés en vert.

Il est généralement considéré que la respiration mitochondriale est inhibée à la lumière, et son estimation est possible par différentes méthodes, décrites dans les méthodes. (Atkin et al. 2000, Peisker et Apel 2001).

Un équilibre redox entre le chloroplaste et la mitochondrie est possible grâce à un échange de métabolites (le NADH peut être transporté via l'antiport oxaloacetate/malate), et des auteurs (Krömer 1995, Krömer & Scheibe 1996) proposent que l'excédent de NADPH chloroplastique est exporté vers les mitochondries, qui utilisent ce pouvoir réducteur en le convertissant en ATP

d. Augmentation de la capacité du métabolisme photosynthétique en réponse à une absorption d'énergie en excès

Chez les plantes exposées à de faibles températures et de fortes lumières, la disponibilité en phosphate pour la formation photosynthétique de l'ATP peut devenir un facteur limitant (Falk et al. 1996, Strand et al. 1999, Hurry et al. 2000). Cette limitation en

phosphate peut être le résultat d'une synthèse réduite des sucres et on observe en conséquence une accumulation d'hexose-phosphate et de PGA et une diminution du ratio ATP/ADP (Hurry et al 1994, 1995, Savitch et al 1997). Une telle limitation n'a pas été observée chez des plantes alpines (*Ranunculus glacialis* et *Soldanella alpina*), suggérant que la photosynthèse à basse température n'est pas limitée par un manque de phosphate (Streb et al. 2003b).

Le maintien des taux d'assimilation du CO₂ et de la photorespiration à des niveaux suffisamment élevés permettrait d'éviter un déséquilibre entre l'énergie lumineuse absorbée et son utilisation, et ainsi de protéger la machinerie photosynthétique de la photoinactivation.

Des variétés hivernales de blé montrent une activité spécifique deux fois plus importante de la fructose-1,6 biphosphatase ainsi qu'une activité de un et demi à deux fois supérieure de la saccharose-phosphate synthase comparée aux variétés printanières (Hurry et al., 1995). L'adaptation d'*Arabidopsis thaliana* à une faible température de croissance provoque une redirection du métabolisme vers la production de saccharose et une augmentation de l'activité des enzymes du cycle de Calvin (Strand et al. 1999). En accumulant plus de saccharose ou de sucre sous forme soluble, les plantes peuvent augmenter leur capacité d'assimilation et de cette façon mieux utiliser l'énergie absorbée.

La capacité photosynthétique est souvent très importante chez les plantes alpines (la photosynthèse n'est pas saturée sous 2000 $\mu\text{mol PFD m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chez plusieurs espèces) et une intensité lumineuse plus élevée (25 à 50 PFD) est nécessaire pour atteindre le point de compensation à la lumière et la saturation de la photosynthèse (Körner et Diemer 1987 ; Germino et Smith 2001 ; Streb et al 2005).

L'assimilation du CO₂ de *Ranunculus glacialis* reste efficace *in situ* dans une gamme très large de conditions climatiques : de 0 à 30°C, sous forte et faibles intensités lumineuses (Moser et al 1977). Les produits primaires de la photosynthèse chez cette espèce sont le fructose et le saccharose, qui ne sont pas respirés immédiatement mais clairement transportés vers des organes de stockage (Nogués et al. 2006). En plus du sucrose, le malate et la ranunculine sont synthétisés en quantité, et comptent pour plus de 50% du carbone soluble total. Cependant, ces composés n'ont pas été marqués durant des expériences de marquage à la lumière (Streb et al. 2003a, Nogués et al. 2006). L'absence de marquage du malate indique que la PEP carboxylase n'est pas impliquée. La faible

activité initiale de la NADPH malate déshydrogénase à forte lumière et le quotient respiratoire d'environ 1 suggèrent que peu d'électrons sont transportés vers la mitochondrie et la valve malate ou oxydés par la respiration (Streb et al. 2005, Nogués et al. 2006), indiquant que l'implication de la valve malate, dans le drainage de l'énergie en excès, n'est pas quantitativement importante. Il n'y a pas d'autre métabolite soluble avec une concentration exceptionnellement forte qui pourrait être synthétisé chez *Ranunculus glacialis*, et qui pourrait expliquer les taux élevés de consommation des électrons, hormis la synthèse de saccharose et l'activité du cycle de Calvin, mais la photorespiration reste un puits d'électrons et d'ATP important, même à basse température.

L'amélioration d'efficacité de l'assimilation du CO₂ observée, attribuée à des capacités photosynthétiques plus élevées, pourrait aussi être expliquée par l'épaisseur des feuilles qui est plus importante (Körner 2003). D'ailleurs, la capacité photosynthétique mesurée sous des conditions de CO₂ saturant, ne montre aucune différence par rapport aux plantes de plaine quand elle est exprimée par concentration de chlorophylle (Streb et al 1997). Il n'y a, par ailleurs, pas de différence de K_m, ni de facteur de spécificité pour la Rubisco chez plusieurs plantes alpines par rapport aux plantes de plaine (Sakata et Yokoi 2002, Kumar et al. 2005, Friend et Woodward 1990).

Enfin, alors que le facteur de spécificité pour le CO₂ augmente pour la Rubisco avec l'altitude (avec la baisse de la température), plus de photorespiration a été mesurée chez certaines plantes alpines par rapport aux plantes de plaine : les capacités de photorespiration sont très importantes même à faible température chez *R. glacialis*. De la même façon, les écotypes alpins de *Trifolium repens* montrent plus de photorespiration que les écotypes de plaine sous les mêmes conditions (Mächler 1978).

Cette forte capacité du métabolisme photosynthétique n'est cependant pas un cas général parmi les plantes alpines (Körner 2003, Streb et al. 1998) et ne permet pas nécessairement l'acclimatation très rapide de la chaîne de transport à des conditions climatiques très variables.

Le processus de la photosynthèse oxygénique dépend d'un système de transport électronique qui doit être particulièrement dynamique dans sa réponse à des changements environnementaux et physiologiques, afin d'éviter la formation d'énergie d'excitation en excès et ainsi la formation de dommages oxydatifs.

1.3 Génération du stress photooxydant

1.3.1 Conditions réductrices

Le froid associé à la lumière forte peut endommager l'appareil photosynthétique. En effet, l'absorption de la lumière est un mécanisme qui n'est pas dépendant de la température dans la gamme physiologique, mais la diffusion des transporteurs dans les membranes des thylacoïdes, ainsi que les activités enzymatiques, sont sensibles à la température.

Sous des conditions de lumière importante, l'absorption d'énergie lumineuse peut être supérieure à ce que les réactions avales peuvent utiliser : Sous des conditions de températures extrêmes associées à une lumière importante, l'apport en énergie lumineuse peut rapidement excéder la capacité d'utilisation de cette énergie par les réactions secondaires, affectées par la température.

Le ralentissement des processus d'assimilation du CO₂ et de la photorespiration (consommant les électrons produits au niveau des photosystèmes) amène alors à un état de réduction prolongé de la chaîne de transport photosynthétique. L'apparition de cet état réduit est très défavorable à la plante, conduisant à la photoinhibition et à des destructions cellulaires occasionnées par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

La mesure de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne permet une estimation rapide de l'état de réduction de la chaîne de transfert des électrons photosynthétique.

1.3.2 Photoinhibition

La photoinhibition est caractérisée par une baisse du rendement quantique de la photosynthèse, associée à la dégradation de protéines PSII. La photoinhibition a été reliée à une sur-réduction du pool des plastoquinones, estimée par les paramètres de fluorescence qL (ou qP) (Huner et al. 1998). La photoinhibition disparaît lorsque les feuilles qui ont été soumises à des lumières excédentaires sont placées sous lumière limitante. Elle ne disparaît pas dans ces conditions lorsque ces feuilles ont été infiltrées par un inhibiteur de la synthèse protéique qui se déroule dans les chloroplastes, la lincomycine par exemple. La photoinhibition de la protéine D1 du centre réactionnel du PSII est le mécanisme le plus étudié (Aro et al. 1993) parmi la gamme des réponses aux dommages causés par l'excès de lumière. Mais la lumière peut aussi inactiver la catalase

et endommager le centre réactionnel du PSI, chez les plantes sensibles au froid (Feierabend 2005 ; Terashima et al. 1994).

Lorsque le pool des PQ est trop réduit, la fréquence d'occupation de la niche par une plastoquinone oxydée est diminuée et QA peut alors être réduite deux fois (elle ne reçoit habituellement qu'un seul électron de la phéophytine). Dans ces conditions, QA rejoint le pool des PQ, après protonation il se produit alors une recombinaison de charges entre les phéophytines et P680+, induisant la formation de Chl à l'état triplet dont la durée de vie peut conduire à la formation de l'oxygène singulet, pouvant oxyder notamment la protéine D1, la rendant ainsi susceptible à l'action des protéases. Cela correspond à l'inhibition du site accepteur.

Il existe aussi une inhibition provenant du coté donneur, quand le manganèse impliqué dans le complexe d'évolution de l'oxygène (OEC) absorbe un photon, notamment dans la gamme des UV. Cela entraîne une diffusion du manganèse hors de l'OEC et dans ce cas le P680 oxydé par la lumière ne peut plus récupérer normalement l'électron qu'il a perdu. Le P680+ et la Tyrz+ formés sont très oxydants, pouvant facilement endommager D1 qui est située dans leur environnement immédiat.

La photoinhibition est un paramètre révélateur de l'état de stress d'une plante face à son environnement et peut être générée soit par une réduction trop importante de la chaîne de transfert (une incapacité pour la plante à conserver la chaîne de transfert photosynthétique oxydée), soit par des processus de réparation insuffisants.

1.3.3 Espèces réactives de l'oxygène

Lors de la photosynthèse, les mécanismes de capture de l'énergie lumineuse et de production de l'oxygène moléculaire par oxydation de l'eau peuvent conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène. Cette production est fortement favorisée par un état réduit de la chaîne de transport.

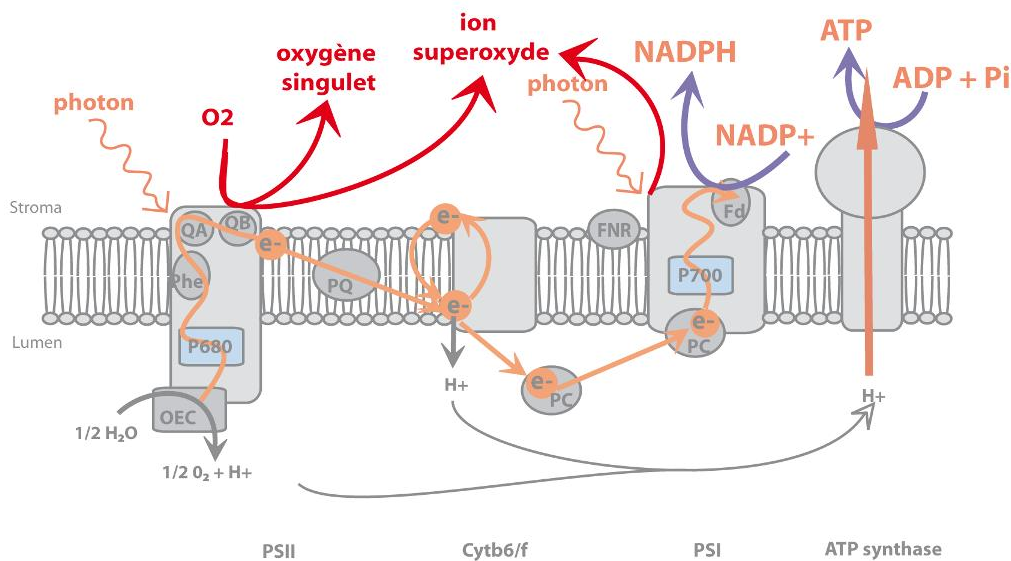
Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont par nature instables et particulièrement réactives.

Elles sont produites de façon constitutive dans le peroxyosome, la mitochondrie, le chloroplaste et la paroi. Elles sont capables de provoquer des dégâts cellulaires importants en provoquant cassures et mutations de l'ADN, en inactivant protéines et des enzymes, en

oxydant les pigments, les sucres et en induisant des processus de peroxydation lipidique au niveau de la membrane cellulaire.

La formation de ROS est inévitable et jusqu'à un certain seuil de concentration les ROS et leurs produits de détoxification peuvent avoir un rôle de signalisation, transmis du chloroplaste au noyau, permettant l'induction d'une acclimatation (Apel & Hirt 2004) (Foyer et Noctor 2005). Par contre, la production importante de ROS génère des dommages oxydatifs reflétés par la photoinhibition, le blanchiment de pigments, la peroxydation des lipides et plus généralement des dommages protéiques et l'inhibition des capacités de réparation, conduisant finalement à la mort cellulaire (Asada 1996, Moller et al. 2007, Takahashi et Murata 2008).

- Au niveau du PSII, dans les antennes ou les centres réactionnels, la chlorophylle excitée à l'état triplet peut transférer son énergie d'excitation à l'oxygène moléculaire et former l'oxygène singulet ($^1O_2^*$), une espèce réactive fortement oxydante.
- Au niveau du PSI, la ferrédoxine peut réduire l'oxygène moléculaire, au lieu du NADP⁺, induisant la formation d'ion superoxyde (O_2^-). Le superoxyde peut générer la formation d'autres ROS tels que le radical perhydroxyl, le peroxyde d'hydrogène, et le radical hydroxyl qui est très toxique (Asada 1996, Apel et Hirt 2004). Cette formation au niveau du PSI peut cependant être utile pour la photoprotection, quand elle est prise en charge par le cycle de l'eau.



(Fig.28) Sites de formation des espèces réactives de l'oxygène lors du transfert d'électrons photosynthétique.

Afin d'éviter la formation de ROS, il est nécessaire que l'apport en énergie par la lumière corresponde avec la capacité d'utilisation de cette énergie par la plante, c'est-à-dire que l'absorption de l'énergie lumineuse soit équilibrée avec les capacités d'assimilation et de photorespiration. Par ailleurs, d'autres mécanismes permettent d'éviter cette formation de ROS, ou de les détoxifier.

1.4 Equilibrer l'absorption d'énergie lumineuse et le métabolisme photosynthétique

1.4.1 Adapter l'absorption de lumière

Des adaptations morphologiques permettent à certaines espèces de limiter l'absorption de lumière (pilosité des feuilles, présence de trichomes) et chez certaines espèces l'inclinaison de la feuille en cas de fort éclairement permet de diminuer l'absorption du rayonnement direct.

Les chloroplastes présentent aussi une capacité de mouvement, permettant d'obtenir une inclinaison parallèle à la lumière incidente et de minimiser de cette façon l'absorption de la lumière. Ces mouvements sont dus au cytosquelette et initiés par la lumière bleue, via

les phototropines. Ce mécanisme permet de diminuer jusqu'à 30% l'intensité de la lumière absorbée, mais ne se retrouve pas chez toutes les espèces.

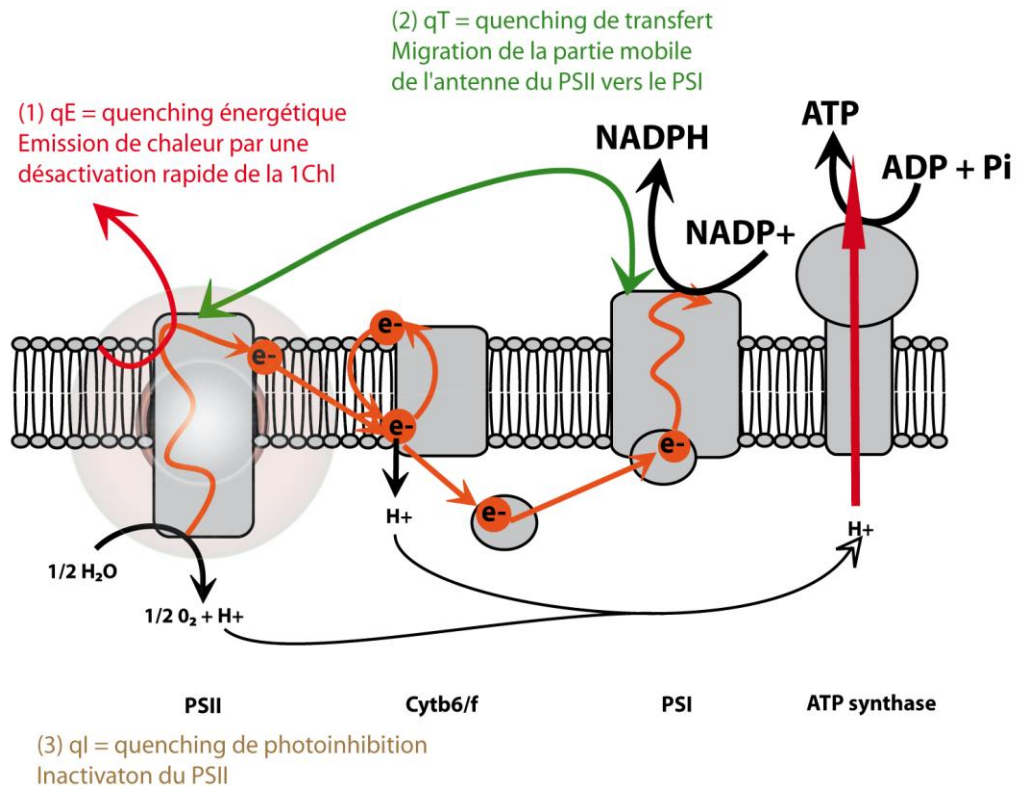
En outre des changements de taille des antennes collectrices de lumière permettent de réguler l'absorption de la lumière en fonction des conditions de développement de la feuille.

A une échelle de temps plus courte, le phénomène de transition d'état permet de faire migrer des antennes associées au PSII vers le PSI. C'est un état de réduction important du pool de plastoquinone qui induit la phosphorylation des complexes associés aux antennes du PSII, et leur migration vers le PSI. Ce mécanisme, en permettant une redistribution de l'énergie d'excitation entre les deux types de photosystèmes, participe au quenching non photochimique (NPQ) de la fluorescence (Müller et al. 2001), sous le terme de qT. Il est cependant peu probable que ce mécanisme joue un rôle important dans la protection contre la lumière excédentaire, étant donné que les complexes sont dé-phosphorylés quand l'intensité lumineuse dépasse $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

1.4.2 Dissipation non radiative de l'énergie en excès

Dans les cas où l'énergie lumineuse absorbée par les photosystèmes dépasse les capacités du métabolisme photosynthétique, la synthèse de l'ATP est ralentie et l'accumulation des H^+ dans le lumen qui est associée à ce ralentissement provoque l'abaissement du pH dans le lumen. Cette acidification initie une augmentation de la dissipation thermique de l'énergie excédentaire au niveau du PSII, estimée par le paramètre du quenching non photochimique (NPQ), mesuré par la fluorescence (Niyogi 1999; Ort & Baker 2002).

On parle de quenching non photochimique de la fluorescence car les voies de dissipation de l'énergie absorbée par les antennes sont en compétition (fluorescence, photochimie ou non photochimique). Ainsi, quand la dissipation par voie non photochimique augmente, les parts de la fluorescence et de la photochimie diminuent.



(Fig.29) Représentation schématique de trois types du quenching non photochimique de la fluorescence : qE, qT et qI

Le NPQ est décomposé généralement en qE, qT et qI.

Le quenching de transition d'état (qT) a été décrit dans la partie précédente.

Le quenching de photoinhibition (qI) correspond à une inactivation des protéines du PSII. Le quenching énergétique (qE), est un mécanisme inductible qui est initié par une chute du pH du lumen (Horton et al. 1996). Cette baisse du pH active la violaxanthine-dé-époxydase (VDE) qui catalyse la conversion de la violaxanthine en anthéranxanthine puis en zéaxanthine dans le cycle des xanthophylles. La régulation de l'activité de la VDE par le pH provoque le changement de localisation sub-cellulaire de l'enzyme : à pH7 elle est libre dans le lumen, en dessous du pH6,5, elle est fortement associée à la membrane thylacoïdienne et son pH optimum de fonctionnement est de 5,2 environ. Ainsi, après acidification, elle s'accroche à la membrane ou se trouve son substrat (la violaxanthine). L'activité de la VDE utilise le pouvoir réducteur de l'ascorbate (ASA), qui vient du stroma.

La formation des anthéranxanthine et zéaxanthine, pigments de la famille des xanthophylles, est corrélée avec la dissipation sous forme de chaleur de l'énergie absorbée par les

antennes. Le changement de pH luminal, induisant un changement de conformation des protéines des antennes (impliquant notamment la protéine PsbS) permet un positionnement favorable de la zéaxanthine par rapport à la chlorophylle (moins de 10Å) et de cette façon le transfert d'énergie entre ces deux molécules.

L'ascorbate, utilisé pour l'activité VDE, est recyclé via la réduction du déhydroascorbate (DHA), qui a lieu dans le stroma. Le déhydroascorbate qui utilise le pouvoir réducteur du glutathion (GSH).

Cette dissipation de l'énergie est fréquemment estimée en tant que quenching non photochimique de la fluorescence (NPQ) (van Kooten et Snel 1990). Plus de 75% de l'énergie lumineuse absorbée peut être dissipée par cette voie (Niyogi 1999).

Une partie du NPQ dépend de la synthèse de zeaxanthine et de la présence de la protéine PsbS (Demming – Adams et Adams 2006) mais il existe aussi un NPQ indépendant de la zeaxanthine (Finazzi et al. 2004; Niyogi 1999).

Chez différentes espèces alpines, malgré une forte variabilité (Williams et al. 2003, Wildi et Lütz 1996, Bravo et al 2007), le pool total des pigments associés au cycle des xanthophylles est de façon générale plus important chez les plantes acclimatées à la lumière par rapport à celles qui ne le sont pas (Bravo et al. 2007).

Les feuilles de *Soldanella alpina*, *Soldanella pusilla* et *Homogyne alpina* possèdent des niveaux de pigments du cycle des xanthophylles et un état de de-époxydation plus élevés que les feuilles de *Ranunculus glacialis*, à la fois à l'obscurité et après exposition à la lumière dans leur environnement naturel et sous des conditions expérimentales (Wildi et Lütz 1996, Streb et al. 1997, 1998).

Chez *Soldanella alpina*, cette capacité augmentée du cycle des xanthophylles par rapport à *Ranunculus glacialis* corrèle avec un NPQ plus important sous 1000 µmol PAR et une température modérée.

Cependant, l'inhibition de la formation des xanthophylles chez *Ranunculus glacialis* n'empêche pas tout le NPQ, (Streb et al. 1998) suggérant la présence d'un NPQ indépendant de la zéaxanthine.

Alors que le NPQ peut être très important chez des espèces de plaine qui sont pourtant très rapidement photoinhibées sous les conditions d'éclairement et de température

présentes en altitude, il ne semble pas être un mécanisme suffisant pour éviter la photoinhibition chez les plantes alpines. En outre, les espèces alpines étudiées montrent fréquemment un transport électronique en excès par rapport à celui utilisé par le métabolisme photosynthétique, indiquant que le NPQ n'est pas suffisant pour assurer un équilibre entre l'absorption de l'énergie lumineuse et son utilisation.

Chez *Ranunculus glacialis*, le fait que le transport électronique reste important sous des conditions de stress suggère que les protections contre la surréduction du système de transfert photosynthétique et la photoinhibition soient principalement dues à des processus en aval du PSII.

1.4.3 Détoxifier les ROS : antioxydants et enzymes antioxydantes

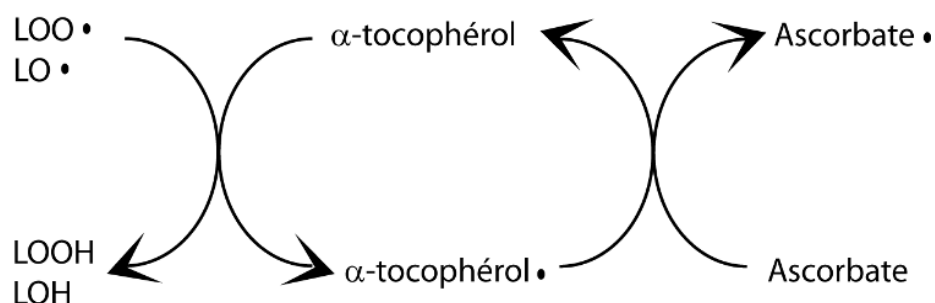
Au niveau du PSII, la formation de l'oxygène singulet est considérée comme un élément participant aux dommages irréversibles causés à la protéine D1 durant le processus de photoinhibition, et il initie la peroxydation des lipides (Aro et al. 1993), (Krieger-Liszkay et al. 2008; Niyogi 1999; Triantaphylidès et al. 2008). Cette formation est amplifiée quand la chaîne de transport des électrons est réduite, c'est-à-dire quand les électrons ne sont pas utilisés par le métabolisme photosynthétique.

Certaines espèces alpines (*Soldanella alpina*, *Ranunculus glacialis* et *Homogyne alpina*) alors que la biosynthèse des protéines est inhibée par la lyncomycine par exemple, restent toujours moins sensibles au stress froid et montrent moins de photoinhibition que des plantes de plaine (Streb et al. 1997). Par ailleurs, le turnover de la protéine D1 est beaucoup plus lent chez *Ranunculus glacialis* et *Soldanella alpina* par rapport à d'autres plantes non alpines dans les mêmes conditions (Shang & Feierabend 1998). Chez ces espèces, il est donc suggéré qu'elles soient plus tolérantes aux conditions photoinhibitoires en ralentissant le taux d'inactivation plutôt qu'en augmentant les capacités de réparation.

Alors que le stress oxydatif est généré à forte lumière et à basse température (Wise 1995, Asada 1996, Ort et Baker 2002), le contrôle de la production de ROS et leur détoxification est probablement clef pour la survie des plantes alpines. Ainsi, une protection renforcée par des activités importantes d'enzymes antioxydatives et/ou

d'antioxydants solubles dans l'eau ou dans les lipides a souvent été interprété comme contribuant à la tolérance aux forte lumières et extrêmes de température (Noctor et Foyer 1998, Ort et Baker 2002).

- Les effets de la formation de l' $^1\text{O}_2$ (oxygène singulet) et de OH^\bullet (radical hydroxyl) sont efficacement limités par l' α -tocophérol (vitE), un antioxydant lipophile des membranes des thylacoïdes. Cet antioxydant permet de stopper les réactions de peroxydation en chaîne des lipides, et il est régénéré grâce à l'ascorbate.



(Fig.30) Représentation schématique de la réaction en chaîne impliquant l' α -tocophérol et l'ascorbate dans la détoxification des lipides peroxydés.

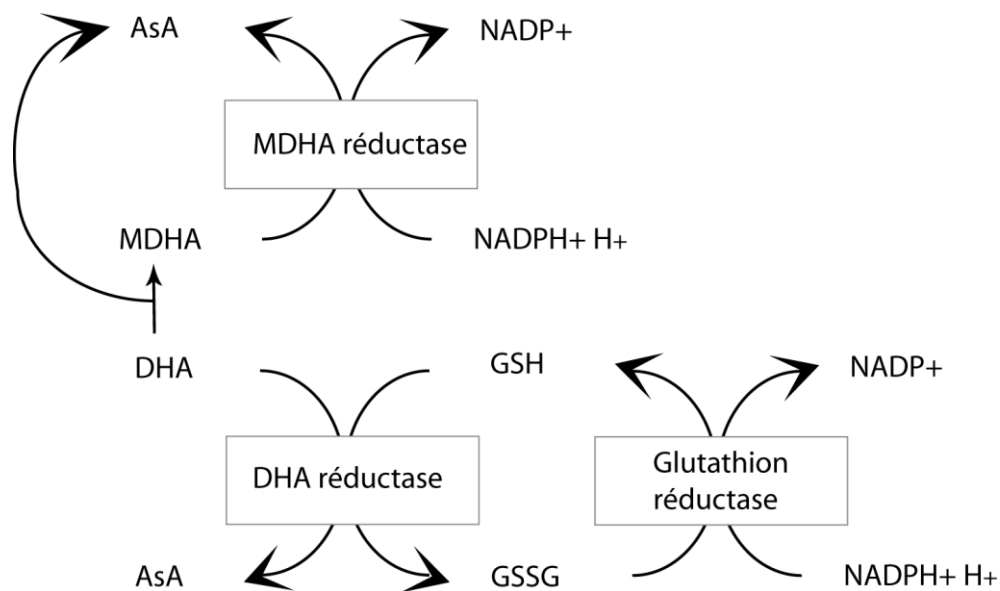
- Les caroténoïdes sont impliqués dans l'élimination (quenching) de l'oxygène singulet et l'évitement de la peroxydation des lipides (Niyogi 1999, Munné-Bosch 2005, Kruk et al. 2005) et notamment, parmi les xanthophylles, la zéaxanthine semble avoir une capacité antioxydante plus importante que les autres (Havaux et al. 2007). Ils assurent par ailleurs le quenching de la $^3\text{Chl}^*$ (Chl triplet) par transfert d'énergie.

Les caroténoïdes jouent aussi un rôle dans la stabilisation de la membrane des thylacoïdes en interagissant avec les lipides, et conduisant ainsi à une augmentation de la stabilité membranaire face à la température et à la réduction de la susceptibilité à la peroxydation des lipides (Havaux 1998).

Par ailleurs, ces pigments jouent un rôle important dans l'absorption de la lumière, en tant que pigments accessoires dans les antennes mais aussi dans les centres réactionnels. Ils

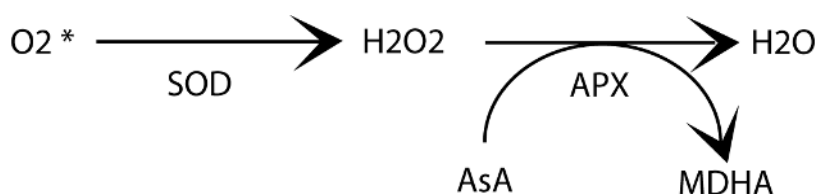
absorbent la lumière entre 400 et 600nm, et l'énergie absorbée peut être transmise aux chlorophylles. Les caroténoïdes jouent donc des rôles divers et primordiaux chez les plantes, et en leur absence les plantes subissent des dommages photo oxydatifs importants.

- L'ascorbate (vitC) a un rôle important dans de nombreux processus de détoxification cellulaire. Il est responsable de la réduction non enzymatique du superoxyde et de la régénération de l' α -tocophérol. Il sert aussi de substrat dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, et joue un rôle dans la conversion de la violaxanthine en zéaxanthine. Les chloroplastes contiennent jusqu'à 40% du pool d'ascorbate de la cellule (Polle, 1997). Lors de ces réactions, la forme oxydée de l'ascorbate, le monodehydroascorbate, est régénéré grâce à la MDHAR (monodéhydroascorbate réductase) et de la DHAR (déhydroascorbate réductase), et au pouvoir réducteur contenu dans le NADPH (Foyer 1997).



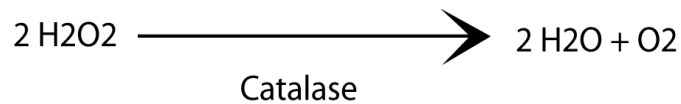
(Fig.31) Représentation schématique de la régénération de l'ascorbate grâce au glutathion et au pouvoir réducteur contenu dans le NADPH. DHA : déhydroascorbate ; MDHA : monodéhydroascorbate ; Asa : ascorbate ; GSH : glutathion réduit ; GSSG glutathion.

- Le glutathion (GSH) joue aussi un rôle important dans les détoxications, notamment dans la protection des protéines à groupement thiols et dans le recyclage de l'ascorbate (Foyer, 1997). Le pool de GSH (glutathion réduit) est maintenu grâce à l'action de la glutathion réductase (GR).
- Au niveau du PSI mais aussi du PSII, la SOD (superoxyde dismutase) catalyse la formation de H_2O_2 à partir d' O_2^- (superoxyde)
- L'ascorbate peroxydase (APX) est une enzyme qui permet de détoxiquer le H_2O_2 . En réduisant le peroxyde d'hydrogène en eau, grâce à l'ascorbate comme donneur d'électron, l'APX est la peroxydase végétale la plus importante pour la detoxification du H_2O_2 (Noctor et Foyer 1998). L'APX est ubiquitaire dans les cellules de la plante, elle est localisée dans le chloroplaste, la mitochondrie, le peroxydosome et le cytosol.



(Fig.32) Représentation schématique des rôles de la superoxyde dismutase (SOD) et de l'ascorbate peroxydase (APX). O_2^* : oxygène singulet ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; AsA : ascorbate ; MDHA : monodehydroascorbate

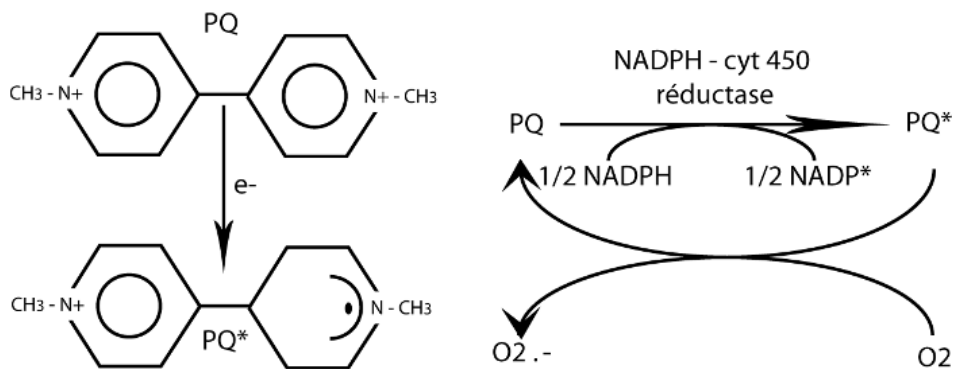
- La catalase (présente dans le peroxydosome) joue un rôle dans la détoxication du H_2O_2 .



(Fig.33) Représentation schématique de l'activité enzymatique de la catalase

En utilisant le NADPH, ces mécanismes ont aussi un rôle important dans le ré-équilibrage du ratio ATP/NADPH.

Chez la soldanelle, l'ascorbate représente le deuxième métabolite carboné majeur de la plante, après le sucrose (Streb et al. 2003a). Cette espèce qui montre une capacité antioxydante très importante est beaucoup moins sensible au paraquat que *Ranunculus glacialis* (Streb et al. 1998). Cependant, les contenus en ascorbate dans les chloroplastes sont équivalents à ceux des plantes qui contiennent des faibles concentrations dans les feuilles (notamment la Renoncule des glaciers, qui montre une distribution de l'ascorbate presque exclusivement dans les chloroplastes (Streb et al. 1997)).



(Fig. 34) Représentation schématique du mode d'action du paraquat. Le paraquat (PQ) est un composé toxique très stable présentant deux pyriniums, des structures pyridiniques dont l'azote porte une charge positive. La présence d'un système réducteur à cytochrome P450 réduit ce composé qui devient un radical PQ*, donneur d'électron. La présence d'O₂ permet la restitution de la forme initiale, PQ, et induit par la même occasion la formation de ROS, via la formation d'une molécule d'anion superoxyde. Le paraquat est un herbicide employé il y a encore peu de temps.

De façon générale, les capacités antioxydantes augmentent avec l'altitude mais une grande variabilité existe entre les espèces. Les contenus en antioxydants et les activités des enzymes antioxydantes sont très faibles chez *Ranunculus glacialis* comme chez *Taraxacum alpinum* et *Dryas octopetala* (Wildi et Lütz 1996, Streb et al. 1997, 1998), suggérant qu'il existe d'autres mécanismes chez ces dernières espèces.

Certaines espèces comme *Ranunculus glacialis* sont capables de conserver la plastoquinone QA dans un état très oxydé, sous des intensités lumineuses et des températures variées. Cet état est associé à une forte capacité de transport électronique. Chez *Soldanella alpina*, l'état des QA est plus réduit et le transport électronique est globalement diminué (Streb et al. 1998, Streb et al. 2003c).

Par ailleurs chez *Ranunculus glacialis* l'activité initiale de NADPH-malate déshydrogénase, qui est un indicateur des conditions réductrices dans le chloroplaste, (Backhausen et al 2000) est basse à mi-journée sous forte lumière sur son site de croissance naturel, suggérant l'absence de conditions réductrices (Streb et al. 2005). De plus, l'ascorbate reste oxydé chez cette espèce pendant la journée tandis ce que le contenu en ascorbate réduit augmente plus que le contenu en dehydroascorbate chez *Soldanella alpina* (Streb et al. 1997).

La Renoncule des glaciers est particulièrement sensible à l'action du paraquat. Cette espèce, qui contient très peu d'antioxydants, ne supporte pas la formation de ROS. Sa chaîne de transport photosynthétique reste pourtant très oxydée, conduisant à l'hypothèse de l'existence d'un autre mécanisme permettant d'éviter la réduction de la chaîne de transport.

1.4.4 Réponse à l'UV

Les UV-B induisent typiquement une activité augmentée d'enzymes antioxydantes, une augmentation de la capacité de réparation de l'ADN et une accumulation des composés phénoliques qui servent de filtres à UV. Deux produits sont formés par l'absorption d'UV B par l'ADN, le CPD (Cyclobutane Pyrimidine Dimer), qui est le plus important en quantité (75%) et le 6-4PP (6-4 pyrimidone photoproduct). Ces produits peuvent conduire à l'empêchement de la réparation de l'ADN durant sa transcription ou sa réplication (Britt 1999). Chez une plante provenant de Patagonie, *Gunnera magellanica* l'UV B affecte

l'ADN mais pas les lipides et conduit à une limitation de la croissance foliaire. Les dommages sur l'ADN semblent donc être à l'origine de l'inhibition de croissance.

Sous conditions naturelles, les plantes s'adaptent aux radiations UV en activant une gamme de réponses protectrices qui impliquent des changements morphologiques, la capacité de réparation de l'ADN, l'induction de composés protecteurs et l'augmentation du niveau d'antioxydants. Parmi ces réponses, celle qui est la mieux caractérisée est l'augmentation des écrans protecteurs. Ces écrans de protections incluent des composés phénoliques dérivés de la phénylalanine (flavonoïdes et autres dérivés des phenylpropanoïdes comme les esters de sinapate), qui accumulent en grandes quantités dans les vacuoles et cellules épidermiques et diminuent efficacement la composante UV de l'irradiation solaire sans changer véritablement la région visible du spectre. Certaines études ont par ailleurs montré que certains composés flavonoïdes ont aussi une fonction d'antioxydant.

Ces composés phénoliques font partie du métabolisme secondaire : flavonoïdes, anthocyanes, lignines, tannins, sont des substances qui se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs groupement hydroxyles, modifiés ou non par des radicaux méthyl, attachés à des structures aromatiques comportant un ou plusieurs noyaux. Deux voies principales sont impliquées dans leur synthèse : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide malonique. La voie de l'acide shikimique conduit entre autres à la formation de deux acides aminés aromatiques importants, la phénylalanine et la tyrosine, à partir desquels dérivent de nombreux composés phénoliques.

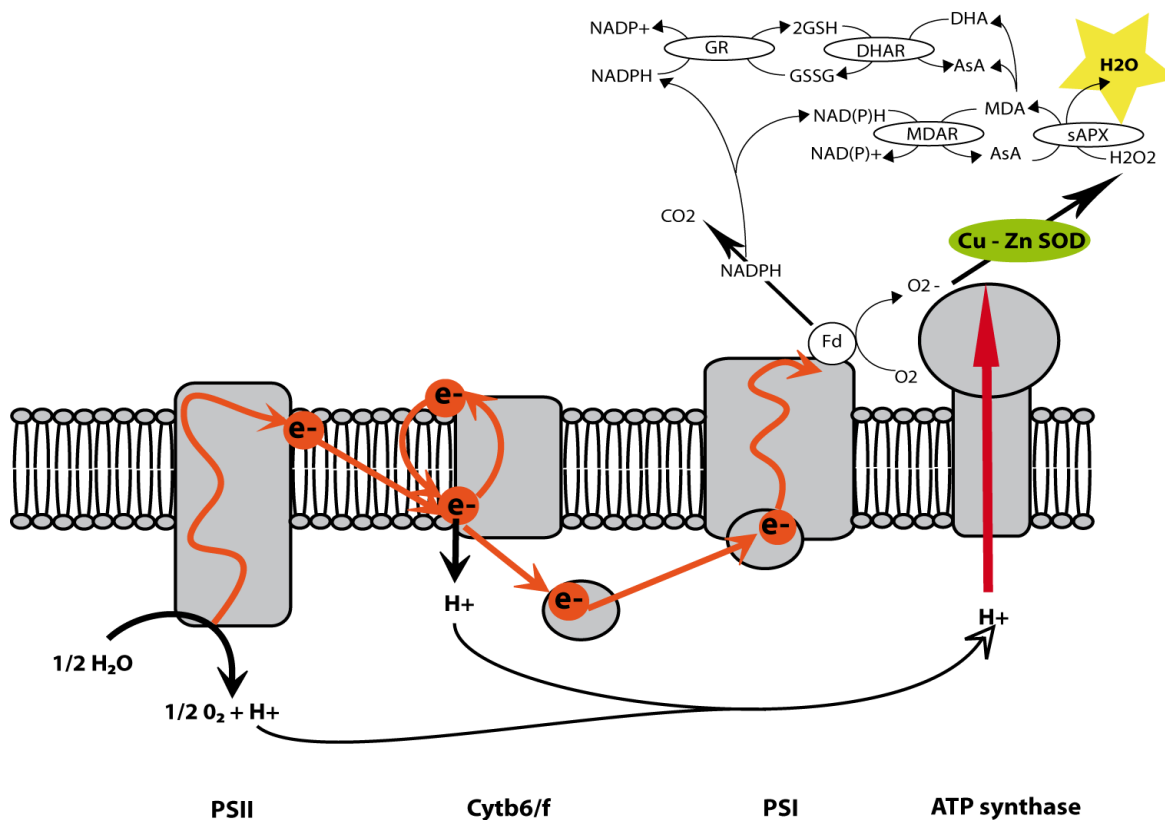
1.5 Voies alternatives de consommation des électrons

En plus du transfert linéaire d'électrons, il existe plusieurs types de transferts alternatifs, évitant la pression électronique dans le système photosynthétique en cas de forte lumière. Ces transferts alternatifs impliquent la réduction de l'oxygène moléculaire dans le processus de la photorespiration, lors des réactions de Mehler au niveau du site accepteur du PSI, mais aussi lors de la chlororespiration, qui implique une réduction suivie d'une ré-oxydation non photochimique du pool des PQ via une oxydase terminale. Par ailleurs, les transferts cycliques autour du PSI permettent la synthèse d'ATP sans mettre en jeu le PSII, via la redirection d'électrons provenant de la ferrédoxine, et, ou, du NADPH vers le pool de PQ et, ou le cytochrome b6f (Joët et al. 2002). La valve malate est aussi

considérée comme un « puit » pour les électrons en excès (Scheibe, 1987). Des électrons peuvent aussi être consommés par la régénération de l'ascorbate, du glutathion, des tocopherols et des hydroperoxydes lipidiques.

1.5.1 Réactions de Mehler

Au niveau du PSI, le transfert d'électrons vers l'oxygène moléculaire est responsable de la formation d'anion superoxyde. Cette production de ROS est prise en charge par un ensemble de réactions enzymatiques qui commence par la consommation d'oxygène et se termine par la production d'oxygène et d'eau, associée à l'établissement d'un gradient de H⁺ et donc à la synthèse d'ATP. (Asada 1999) appelle cette séquence photophosphorylation pseudocyclique, d'autres l'appellent le cycle de l'eau.



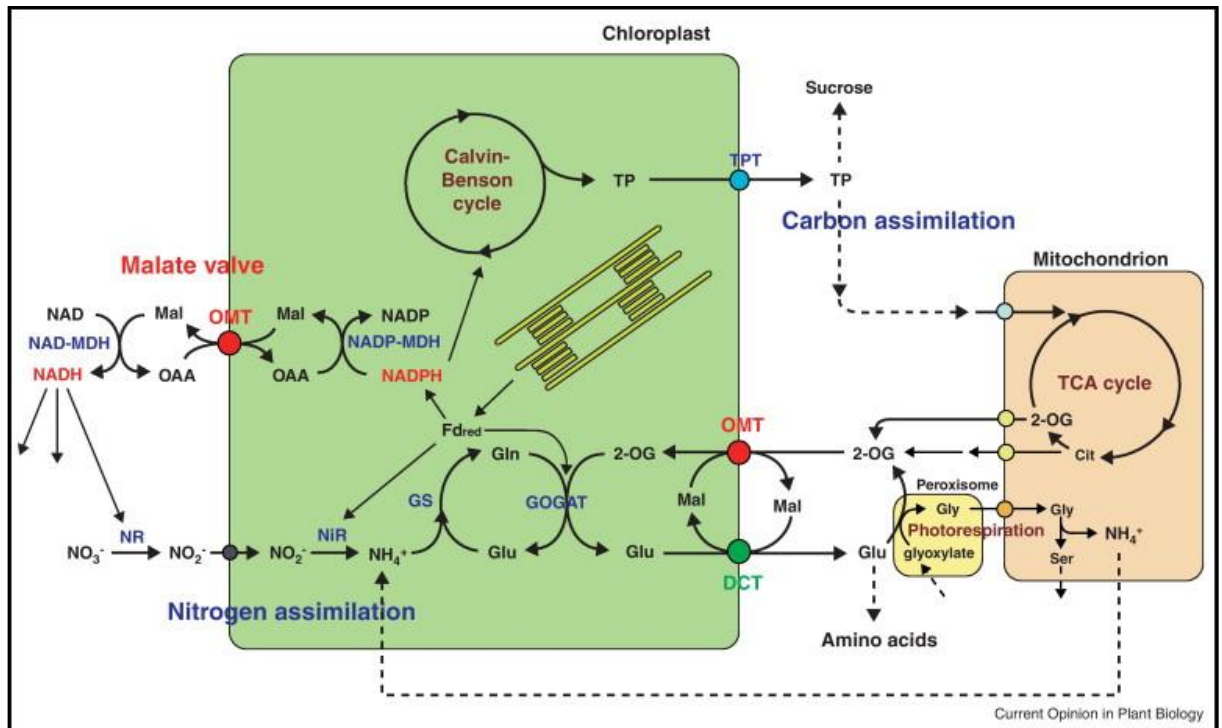
(Fig.35) Représentation schématique du cycle de l'eau. En premier lieu, la SOD (superoxyde dismutase) catalyse la transformation des anions superoxyde (ou radicaux superoxyde) en H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène), qui est lui-même réduit en H₂O par l'APX (Ascorbate peroxydase). L'ascorbate oxydé est régénéré soit via la ferredoxine et une monodehydroascorbate réductase NADP-dépendant, soit via une déhydroascorbate réductase et la glutathion réductase (Miyake et Asada 1994).

Asada (1999, 2000) suggère que ces réactions interviennent principalement dans la dissipation de l'énergie absorbée en excès en cas de stress, mais d'après Driever & Baker (2011) la consommation d'O₂ par les réactions de Mehler ne représenterait pas un flux d'électrons important chez les plantes C3.

Etant donné que les capacités antioxydantes sont variables chez les espèces alpines, on peut supposer que la consommation d'électrons par la réaction de Mehler puisse être relativement basse chez la Renoncule des glaciers, notamment (Laureau et al. 2011).

1.5.2 Valve du malate

Sous des conditions réductrices, la NADP-malate deshydrogénase est activée et des électrons sont utilisés pour générer du malate. La NADP-malate deshydrogénase (NADP-MDH) utilise le NADPH en excès pour convertir l'oxaloacétate (OAA) en malate afin de régénérer l'accepteur d'électron NADP. Son activité est inhibée par le NADP, mettant ainsi fin à sa propre activité quand tout le NADPH est requis et consommé par les processus d'assimilation et ne doit donc pas être exporté sous forme de malate (Scheibe 1991). Le transfert de ces équivalents réduits en dehors du chloroplaste peut avoir un rôle significatif dans des conditions de lumière en excès (Fridlyand et al. 1998, Scheibe 2004). Comme la production d'ATP continue alors que les électrons sont transférés au malate, cette fonction de « valve malate » joue un rôle utile dans le rééquilibrage du ratio ATP/NADPH dans le chloroplaste. Le malate peut être exporté du chloroplaste et utilisé pour les processus de réduction dans la cellule, ou oxydé dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Transféré dans d'autres compartiments cellulaires le malate peut avoir différents rôles : il peut être converti en OAA dans le cytosol pour donner le NADH nécessaire à la réduction du nitrate, il peut être stocké dans la vacuole, il peut être métabolisé dans la mitochondrie pour former de l'ATP, ou bien utilisé lors de la photorespiration. Il a aussi été suggéré qu'une partie du malate soit impliquée dans la synthèse d'acides gras dans le chloroplaste après avoir été converti en pyruvate (Krömer et Scheibe 1996).



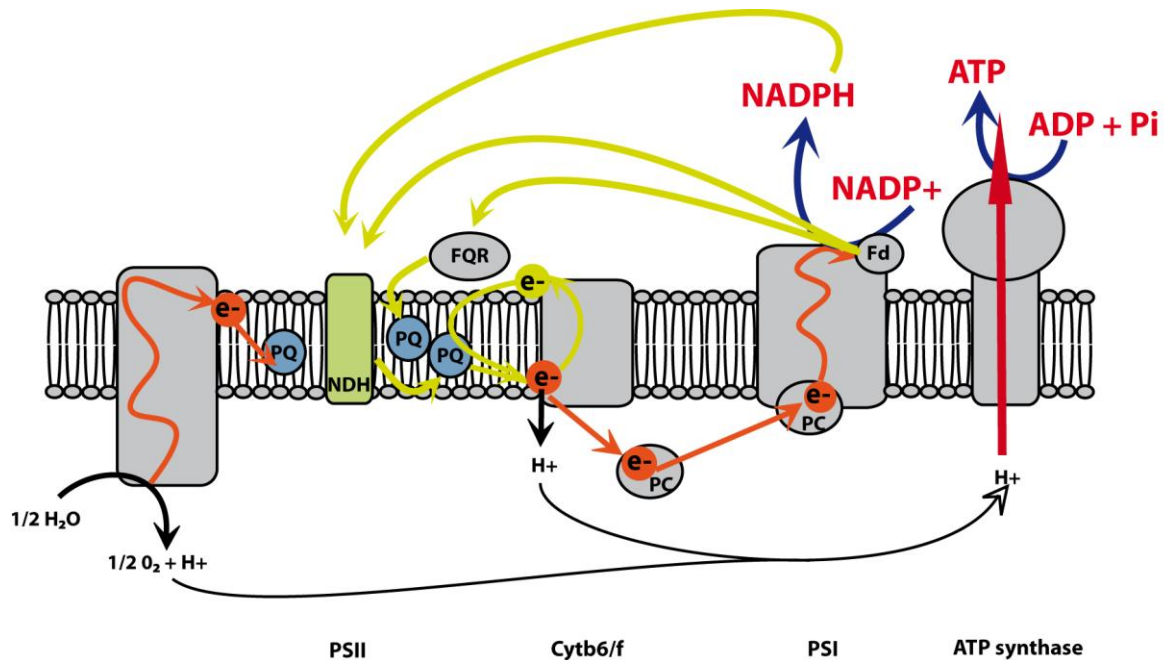
(Fig. 36) Représentation schématique de l'implication de la valve du malate dans les différents compartiments de la cellule. Taniguchi et al. 2012

1.5.3 Transferts cycliques autour du PSI

Au niveau du PSI, des électrons peuvent être transférés à partir de molécules à fort pouvoir réducteur (Fd, FNR, NADPH) vers le pool des PQ et le cytb₆/f, permettant la synthèse d'ATP par la translocation de H⁺ du stroma vers le lumen du thylacoïde, sans impliquer le PSII (Huber et Edwards 1976, Malkin et Chain 1980). Alors que tous les complexes protéiques impliqués dans cette réaction ne sont pas encore identifiés, plusieurs voies distinctes de transfert cyclique autour du PSI sont supposées :

- Une première est sensible à l'antimycine A, et alors que cet antibiotique n'affecte pas le cytb₆/f ni le transfert linéaire, et la ferredoxine réduite étant capable de réduire la chaîne de transfert d'électrons (Kimata –Ariga et al. 2000), cette voie impliquerait une Fd-PQ oxydoréductase (FQR), enzyme qui pourrait constituer le site d'action de l'antimycine A (Cleland et Bendall 1992) ;
- Une seconde voie impliquerait une NAD(P)H-PQ oxydoréductase (NAD(P)H-QR) (Peltier & Cournac 2002).

L'implication du cytb6/f semble nécessaire au transfert cyclique autour du PSI car ce dernier est sensible au DBMIB, analogue des quinones qui agit au niveau du site Q0 (Trebst 1980 ; Cleland et Bendall 1992). Le retour des électrons du côté accepteur du PSI se faisant, lui, préférentiellement au niveau du pool des PQ.



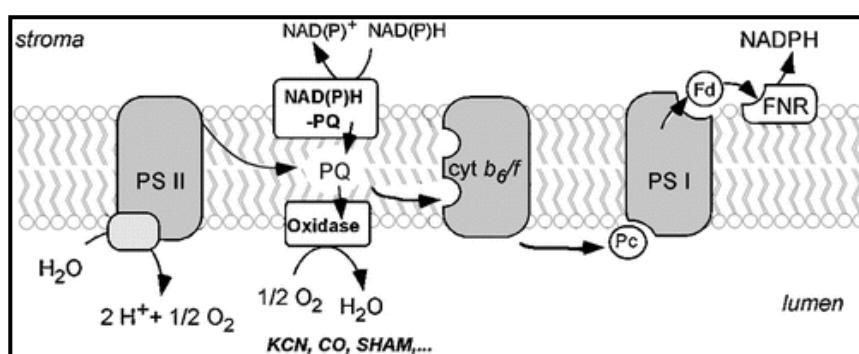
(Fig. 37) Représentation schématique des différentes voies de transfert cyclique d'électrons autour du PSI. FQR : ferrédoxine PQ oxydoréductase.

Cette synthèse d'ATP dissociée de la genèse de pouvoir réducteur permettrait le ré-equilibrage du ratio ATP/NADPH dans les chloroplastes et ainsi l'optimisation du cycle de Calvin. Cependant, il est considéré que son activité est faible, et son rôle mineur dans l'assimilation du CO₂ chez les plantes C₃ (Bendall et Manasse 1995), sauf dans des conditions de stress où cette activité serait stimulée et permettrait une protection du PSII grâce à un contrôle de son activité par le pH du lumen (Cornic et al. 2000).

Ainsi, le flux cyclique des électrons autour du PSI est considéré comme pouvant augmenter le gradient de pH autour de la membrane thylacoïdienne et réguler l'énergie de dissipation au niveau du PSII afin de protéger la plante de photoinhibition destructive (Manuel et al. 1999). Le flux cyclique autour du PSI peut augmenter le ration ATP/NADPH par rapport au flux linéaire d'électrons et moduler le NPQ au niveau du PSII (Joliot & Joliot 2005; Rumeau et al. 2007).

1.5.4 Chlororespiration

Au début des années 80, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'existence d'une interaction entre le pool des PQ et l'oxygène moléculaire est suggérée par l'effet d'inhibiteurs d'oxydases respiratoires sur l'état redox du pool des PQ à l'obscurité (Bennoun 1982). A ce moment, le terme de chlororespiration désigne une activité respiratoire hypothétique impliquant la chaîne de transfert chloroplastique, conduisant à la réduction non photochimique du pool des PQ et à sa ré-oxydation non photochimique, utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur final d'électrons. Associé à cette oxydoréduction, un gradient électrochimique serait généré de part et d'autre de la membrane du thylacoïde.



(Fig.38) Représentation schématique de la chlororespiration par (Gilles Peltier & Laurent Cournac 2002).

Cependant, la découverte d'une communication redox entre le chloroplaste et la mitochondrie remet en cause ce modèle de la chlororespiration, notamment alors qu'il est montré chez *Chlamydomonas reinhardtii* que l'inhibition de la respiration mitochondriale conduit à une augmentation de la concentration de NADPH dans les chloroplastes, induisant une réduction non photochimique du pool des PQ (Gans et Rebeillé 1990, Bennoun, 1994).

Mais, Peltier (et al. 1987) montrent que des flashes lumineux inhibent transitoirement une consommation d'O₂ de type respiratoire chez *Chlamydomonas reinhardtii* et que cette réponse n'est pas sensible à l'inhibition de la respiration mitochondriale. Puis (Cournac et al. 2000) et (Peltier et al. 1988), montrent que chez des souches de *Chlamydomonas reinhardtii* sans PSI ou cyt b₆/f, les électrons provenant du PSII peuvent être consommés

à un rythme important par une oxydase située entre le PSII et le cytb6/f, probablement au niveau du pool des PQ.

Ce phénomène est attribué à la chlororespiration. Harris et Heber (1993) montrent ensuite qu'après réduction du pool des PQ par une forte illumination, celui-ci est ré-oxydé par une voie non photochimique faisant intervenir l'O₂. Kruk et Strzalka (1999) proposent l'implication du cytochrome b559 dans cette ré-oxydation tandis que (Casano et al. 2000) proposent une hydroquinone peroxydase.

La chlororespiration est caractérisée comme étant une chaîne de transport électronique respiratoire en interaction avec la chaîne de transfert chloroplastique et permettant le transfert vers l'oxygène d'électrons provenant du NAD(P)H, via le pool des PQ (Bennoun, 1982). Il est supposé que cette réaction fasse intervenir d'une part une enzyme capable de réduire le pool des PQ (NAD(P)H déshydrogénase) et d'autre part, une enzyme permettant la réoxydation du pool des PQ et utilisant l'oxygène comme accepteur final (non identifiée alors).

Différents rôles ont été proposés pour la chlororespiration : Bennoun (1982), suggère un rôle à l'obscurité, assurant une production d'ATP; Gfeller et Gibbs (1985) et Singh et al (1992) proposent une fonction de ré oxydation de pouvoir réducteur produit par la dégradation de l'amidon ; Peltier et Schmitt (1991) ainsi que Lajko et al. (1997) supposent un rôle dans l'acclimatation à des conditions environnementales extrêmes. Mais alors qu'aucun candidat pour l'oxydase chloroplastique ne faisait de consensus, l'existence de cette activité chlororespiratoire était très controversée (Bennoun 1994, Nixon 2000).

Cependant, la découverte du mutant *immutans* a permis de revenir sur cette théorie.

1.6 Protéines carboxylates diferriques non héminiques et transfert alternatif d'électrons

1.6.1 Le mutant *immutans*

La découverte de plantes d'*Arabidopsis thaliana* présentant un phénotype de variégation (pigmentation sectorisée de la feuille, verte et blanche) date du début des années 70 (Chung et Redei 1974).

Dans ces feuilles, les cellules provenant des secteurs verts possèdent des chloroplastes avec une apparence normale, mais les cellules provenant des secteurs blancs possèdent des plastes vacuolisés à qui il manque pigments et structures membranaires internes (Wetzel et al. 1994).

Le degré de sectorisation est sensible à la température et à la lumière : sous forte lumière ou température élevée, l'importance des secteurs blancs augmente et sous faible lumière elle diminue. Sous lumière très faible, les plantes sont entièrement vertes (Wetzel et al. 1994, Wu 1999).

Cette variégation apparaît très tôt dans le développement des feuilles, et est irréversible : cette mutation est alors qualifiée de « *immutans* » (*im*) (Cournac 2000).

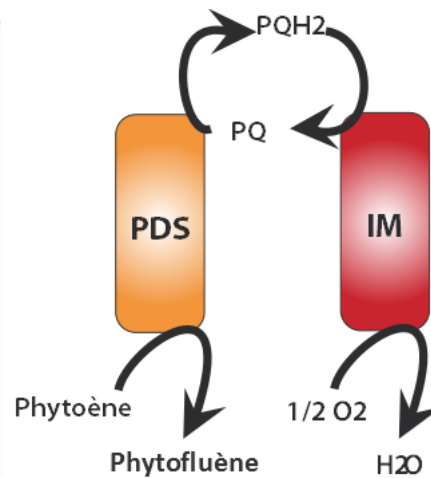
Ces secteurs blancs accumulent du phytoène, un intermédiaire incolore de la synthèse des caroténoïdes (Wetzel 1994), indiquant qu'*im* a une déficience dans l'activité de la phytoène désaturase (PDS), enzyme responsable de la conversion du phytoène en ζ -carotène (*Cf Annexe*).

Les premières études montrent que la mutation ne concerne pas directement le gène de la PDS (Wetzel 1994), car *PDS* et *IM* sont localisés dans des chromosomes différents. Par ailleurs, l'expression du gène PDS n'est pas affectée (ni au niveau des ARN messagers, ni au niveau des protéines) par *im* (Wetzel 1998), suggérant que *IM* affecte PDS de façon indirecte.

Bramley (1985) montre que PDS est localisée dans la membrane des thylacoïdes et que son activité nécessite la présence de quinones oxydées (Mayer 1990).

Plus tard, des mutants d'*Arabidopsis thaliana* *pds1* et *pds2* présentant un phénotype albinos et accumulant du phytoène à cause d'un blocage dans la voie de synthèse des PQ,

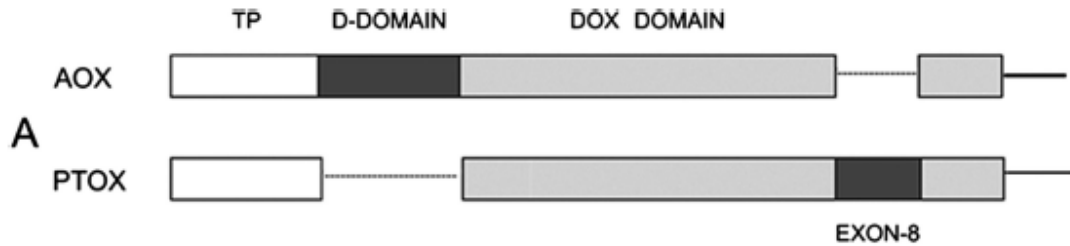
confirment que les PQ sont un élément essentiel pour l'activité de la PDS (Norris et al. 1998).



(Fig.39) Phénotype de variéation chez *im* (Fu) et schéma montrant l'implication d'IM dans l'activité PDS. Via la PDS, les électrons sont transférés du phytoène à la plastoquinone et ensuite de la plastoquinone à l'oxygène moléculaire, via IM. L'absence d'IM conduirait à la sur-réduction du pool des PQ, et serait responsable de l'accumulation de phytoène dans les membranes. Ainsi, la production de caroténoïdes, responsables de la photoprotection est déficiente. Sous des conditions de fortes illuminations, des plastes photo-oxydés sont générés donnant lieu à l'apparition de secteurs blancs tout au long du développement de la feuille.

C'est en 1999, alors qu'il est déjà suggéré que des électrons provenant du phytoène soient transférés au pool de PQ via la PDS, puis à l'O₂ par une ou plusieurs réactions redox, qu'IM est cloné : *im* provient d'une mutation récessive sur un gène nucléaire (Carol et al. 1999).

Chez *Arabidopsis*, le gène *IM* mesure 2557 paires de bases (pb) et contient 8 introns et 9 exons. L'ADNc code pour une protéine de 347 acides aminés, donc les 50 premiers correspondent à un peptide d'import au chloroplaste (Carol et al. 1999, Fu et al. 2005). Des homologues d'IM ont été clonés chez la tomate GHOST, (Josse et al. 2000), chez le poivron (Josse et al. 2000) et le riz (Os1M1, Kong et al. 2003), mais sont aussi trouvés chez des algues et des cyanobactéries (Mc Donald 2009).



(Fig.40) La PTOX présente une homologie de séquence importante avec l'alternative oxydase mitochondriale, AOX. (Fu 2009)

IM est proche de l'AOX (Alternative oxydase) des membranes internes de la mitochondrie (Wu 1999, Carol 1999), et son activité plastoquinol oxydase est montrée *in vitro* et *in vivo* (Cournac et al. 2000; Josse et al. 2000; Joët et al. 2002). Cette activité oxydase terminale dans le plaste fait qu'elle est qualifiée de « plastid terminal oxydase » ou PTOX (Carol & Kuntz 2001; Peltier & Cournac 2002).

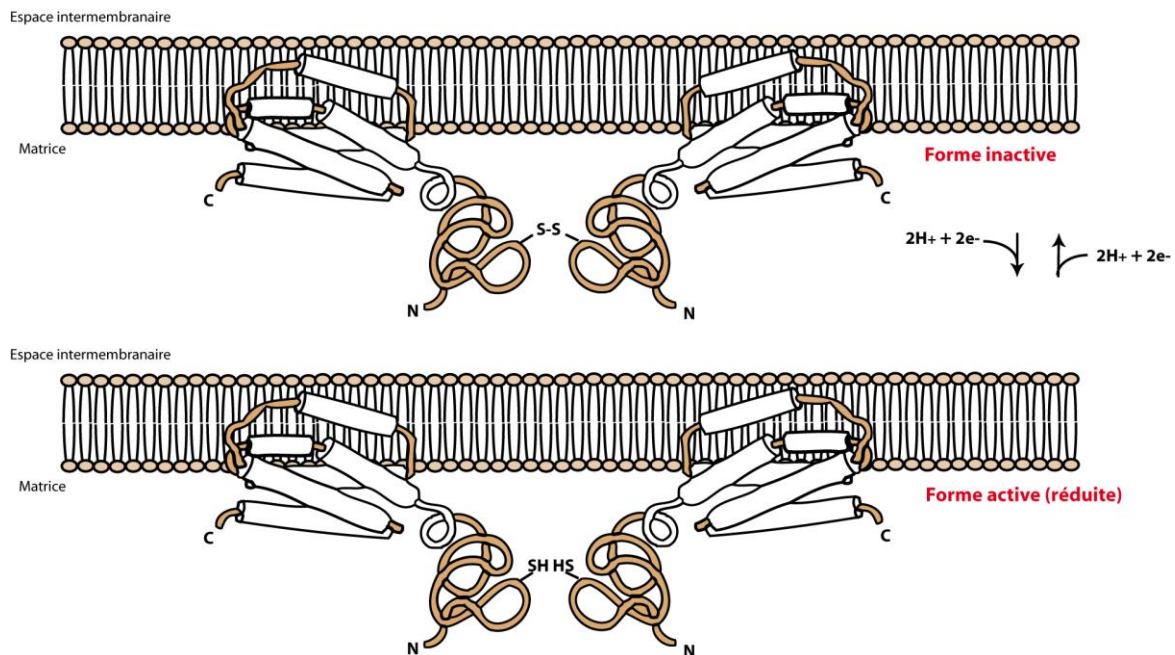
La PTOX devient alors le candidat à la fonction d'oxydase chloroplastique impliquée dans la chlororespiration.

1.6.2 L'oxydase alternative mitochondriale

L'AOX, présente chez toutes les plantes ainsi que chez certains champignons et protozoaires, est une enzyme catalysant la réduction de l'oxygène moléculaire à partir d'électrons (4) provenant du pool d'ubiquinone (Vanlerberghe 1997, Siedow 2000). Cette voie alternative de transfert électronique ne contribue pas à l'établissement du gradient de proton, en évitant l'expulsion de 2 H⁺.

On considère qu'elle a un rôle dans la régulation du métabolisme carboné et de la chaîne de transport électronique mitochondriale (Affourtit 2002), en permettant d'assurer rapidement la glycolyse et le cycle de Krebs en cas de surcharge de la voie des cytochromes (causée par des niveaux d'ATP élevés). Sous conditions normales, l'AOX est faiblement exprimée dans les mitochondries de plantes (sauf chez les Aracées où elle est responsable de la thermogénèse des organes floraux), mais son expression est fortement stimulée en conditions de stress biotiques et abiotiques. Kumar et al. (2007) écrivent que différentes espèces de haute altitude montrent des plus grandes quantités d'AOX par rapport aux mêmes espèces de basse altitude. Sous conditions de stress elle

pourrait donc jouer un rôle dans la diminution de la formation de ROS durant le transport des électrons (Yip 2001).



(Fig.41) Représentation schématique du mode de régulation de l'AOX.

Chez les plantes, cette protéine de 34 kDa environ se trouve dans la membrane sous forme d'un dimère de 64 kDa et est codée par plusieurs gènes nucléaires qui peuvent être organisés en deux types, AOX1 et AOX2. Ce dimère est inactivé par une liaison covalente, un pont disulfure au niveau de résidus cystéine. L'activation du dimère est réalisée par la thioredoxine, mais son activité est régulée par la présence de certains alpha-cétoacides, comme le pyruvate notamment. In vivo, la thioredoxine utilise le NADPH de la matrice mitochondriale, qui est généré par une NADP-isocitrate déshydrogénase. Le citrate peut par ailleurs stimuler la synthèse de l'AOX. Cet ensemble de facteurs constitue un mécanisme de régulation sophistiqué, via lequel l'abondance de l'AOX et son activité est régie par le statut carbonné de la cellule (Harvey Millar 2011).

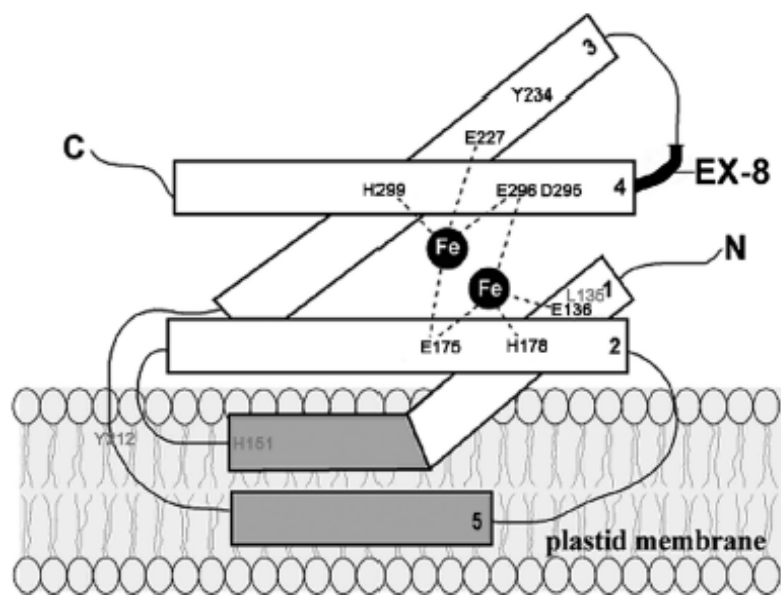
1.6.3 PTOX

La PTOX est présente uniquement chez des organismes photosynthétiques : cyanophages, cyanobactéries et plantes supérieures. La protéine mature a une taille de 37kDA, et est

localisée dans la membrane des thylacoïdes, principalement dans thylacoïdes membranaires, orientée vers le stroma (Joët et al. 2002; Lennon et al. 2003).

La PTOX et l'AOX sont membres de la famille des protéines DOX (non-hème diiron carboxylate protein) et la PTOX a été modélisée comme étant une protéine membranaire avec un site actif (DOX), exposé coté stroma. Ce site actif est composé de d'un groupement de quatre hélices qui fournit six sites de liaison des centres di ferriques (quatre résidus glutamate et deux résidus histidine). E136, E175, H178, E227, E296 et H299 (numérotation de la séquence d'*A. thaliana*). Ces acides aminés sont conservés chez toutes les protéines PTOX et AOX examinées, et sont essentiels pour l'activité de la PTOX (Fu et al. 2009). Un autre domaine, correspondant à l'exon 8 (16 AA) de la PTOX, est essentiel pour la conformation et la stabilité de la protéine et est conservé chez toutes les espèces analysées. Par contre on ne le trouve pas dans l'AOX (Fu et al. 2005).

Par ailleurs, cinq autres acides aminés sont essentiels pour l'activité de la PTOX *in vitro* : L135, H151, Y212, Y234 et D295, les deux derniers sont aussi essentiels pour son activité *in planta* (Fu 2009).



(Fig. 42) Modèle structural de la PTOX. Il est aujourd'hui considéré que la PTOX possède quatre hélices α et un centre di-férrique. L'exon 8, qui est seulement présent chez la PTOX, est représenté en gras. Les acides aminés importants pour l'activité de la PTOX sont montrés en gris et ceux essentiels pour son activité sont indiqués en noir. (Fu et al. 2005)

Etant donné que la PTOX peut accepter les électrons provenant du PSII via le pool des plastoquinones et du flux cyclique autour du PSI via différentes plastoquinone réductases, son activité est considérée comme pouvant jouer un rôle en tant que valve de sécurité, permettant de conserver le pool des PQ oxydé et d'éviter la sur réduction dans le chloroplaste et ainsi la photoinhibition (Carol et Kuntz 2001, Peltier et Cournac 2002, Nixon et Rich 2006, Quiles 2006, Rumeau et al. 2007, Shahbazi et al. 2007, Tallon et Quiles 2007, Diaz et al. 2007).

Chez la majorité des plantes testées, la protéine PTOX est présente sous de très faibles concentrations et la consommation d'électron qui y est associée représente moins de 1% de l'activité totale de transport électronique (Ort et Baker 2002). Cependant, sous des conditions de forte lumière, de températures extrêmes (basse ou forte), les niveaux de PTOX sont plus élevés chez différentes espèces (Quiles 2006; Tallón & Quiles 2007; Rumeau et al. 2007; Busch et al. 2008).

Groups	Conditions de stress	Espèces	Niveau de détection	References
Plantes supérieures	Chaleur ; forte lumière	<i>Avena sativa</i>	Protéine, activité	Quiles 2006, Tallon et Quiles 2007
	Chaleur ; forte lumière	<i>Brassica fruticulosa</i>	Protéine, activité	Diaz et al. 2007
	Chaleur ; forte lumière	<i>Brassica oleracea</i>	Protéine, activité	Diaz et al. 2007
	Sécheresse	<i>Coffea arabica</i>	mRNA	Simkin et al. 2008
	Salinité	<i>Oryza sativa</i>	mRNA	Kong et al. 2003
	Froid	<i>Pinus banksiana</i>	Protéine	Busch et al. 2008
	Froid	<i>Pinus contorta</i>	Protéine	Savitch et al. 2010
	Forte lumière	<i>Ranunculus glacialis</i>	Protéine	Streb et al. 2005
	Forte lumière	<i>Solanum lycopersicum</i>	Protéine	Shahbazi et al. 2007
	Secheresse, chaleur, forte lumière	<i>Spathiphyllum wallisii</i>	Protéine	Gamboa et al. 2009 ; Ibanez et al. 2010
	Salinité	<i>Thellungiella halophila</i>	Protéine, activité	Stepien et Johnson 2009
	Algues	Privation en phosphate	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	mRNA
Forte lumière, excès de fer, salinité		<i>Haematococcus pluvialis</i>	mRNA	Li et al. 2008, 2010 ; Wang et al. 2009

Table2. Résumé des conditions induisant un niveau augmenté de la PTOX chez différentes espèces de plantes supérieures et d'algues, sous différentes conditions de stress. (A partir de Sun & Wen 2011)

Toutes les plantes alpines analysées montrent des contenus en PTOX élevés par rapport aux plantes de plaine (Streb et al. 2005), et chez *Geum montanum*, espèce qui est distribuée de 1800 à 2800 mètres d'altitude dans les Alpes, le contenu en PTOX augmente avec l'altitude.

Chez ces espèces alpines, considérant le contenu élevé en PTOX et son activité supposée, il est supposé que l'association de l'activité oxydase de la PTOX à celle du flux cyclique autour du PSI pourrait fonctionner comme une valve de sécurité sous des fortes lumières et des stress environnementaux. L'excès de lumière absorbée par le PSII serait dirigé vers l'O₂ via la PTOX tandis que la lumière excès absorbée par le PSI serait prise en charge par le flux cyclique autour du PSI.

Un contenu en PTOX particulièrement élevé est mesuré chez *Ranunculus glacialis*, et cette espèce montre une proportion importante du transport électronique qui ne peut être attribuable ni à l'assimilation ni à la photorespiration (Streb et al. 2005). De plus, le contenu en PTOX diminue jusqu'à ne plus être détectable chez *Ranunculus glacialis* quand des plantes sont cultivées à basse altitude pendant quelques semaines et la sensibilité des plantes à la photoinhibition augmente (Streb et al. 2005, 2003a).

Par ailleurs, le contenu en NDH H, protéine faisant partie de la NADPH plastoquinone réductase qui catalyse le transport cyclique autour du PSI via la NADPH, diminue parallèlement à la PTOX, chez les plantes qui sont dé-acclimatées (Streb et al 2005).

Etant donné la capacité de *R. glacialis* à éviter les conditions réductrices dans le chloroplaste, mais aussi sa sensibilité importante aux conditions de stress oxydatif, l'hypothèse d'une fonction protectrice de la PTOX associée au transport cyclique du PSI est supposée.

Ce rôle supposé chez les plantes supérieures est confirmée par l'absence d'autre quinol oxydase dans les chloroplastes des plantes supérieures, et par l'expression du gène chez *Escherichia coli*, montrant une consommation d'oxygène insensible au cyanure et sensible au propyl-gallate (Mc Donald 2009). Le plastoquinol est l'unique substrat de la PTOX et lors du processus de transfert des électrons du PSII vers la PTOX, le fait que la stœchiométrie de l'échange d'O₂ soit de 1 (Cournac 2000, Joët 2002), implique que le produit final de la réduction de l'oxygène moléculaire est l'eau.

Le rôle supposé ici de la PTOX est cependant controversé : des aiguilles de pin dans lesquelles le contenu en PTOX est important durant l'acclimatation à l'hiver (Busch et al. 2008), et *Arabidopsis thaliana*, chez qui la protéine a été surexprimée (Rosso et al. 2006), montrent des états de réduction de QA similaires à ceux de plantes avec un contenu faible en PTOX, suggérant que la PTOX ne consomme pas les électrons en excès au niveau du pool de PQ. Par ailleurs, la PTOX d'*Arabidopsis thaliana*, surexprimée chez le Tabac (Heyno et al. 2009) semble induire la génération de superoxyde conduisant à une photoinhibition importante sous forte lumière.

Cependant, des éléments probants concernant une fonction protectrice de la PTOX provient d'expériences sur *Chlamydomonas reinhardtii* (Cournac et al. 2002), sur des plantes transgéniques déplétées des activités catalase ou ascorbate peroxydase (Rizhsky et al. 2002), sur *Avena sativa* et deux espèces de *Brassica* (Quiles 2006, Diaz et al. 2007, Tallon et Quiles 2007).

Les plantes alpines montrant des quantités importantes de PTOX (Streb et al. 2005), l'objectif de ce travail est de tenter de modifier le contenu en PTOX chez la plante alpine *Ranunculus glacialis* par un changement de conditions environnementales afin de savoir si une corrélation existe entre la quantité de PTOX dans le chloroplaste et un transfert électronique vers l'oxygène associé à une baisse de l'état réduit du pool des PQ.

Chapitre 2

/

Chapter 2

2. Matériel et Méthodes

2.1 Matériel végétal

2.1.1 *Ranunculus glacialis* L.

Ranunculus glacialis pousse naturellement à partir de 2400 mètres d'altitude dans la région du Col du Lautaret/Galibier dans les Alpes française. Deux sites ont été déterminés à 2400 mètres et à 2700 mètres d'altitude, et les plantes ont aussi été conservées en pots à 2100 mètres (dans une zone proche du laboratoire). Des plantes sont aussi conservées, en pots, en chambre froide à Orsay.

2.1.2 *Soldanella alpina* L.

Soldanella alpina pousse naturellement à moins de 2000 mètres d'altitude jusqu' à 3000 m d'altitude dans les Alpes. Deux sites ont été déterminés, à 2100 mètres et à 2400 mètres d'altitude, et des plantes ont aussi été conservées, en pots, en chambre froide à Orsay.

2.1.3 *Arabidopsis thaliana*

Des écotypes Col0 d'*Arabidopsis thaliana* sont cultivés en chambre climatique sous une lumière de 120 PFD ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), avec une photopériode de 16h (20°C le jour, 16°C la nuit), à Orsay.

2.1.4 *Nicotiana tabacum*

La variété petit Havana de *Nicotiana tabacum* est cultivée en serre, sous une lumière de 350 $\mu\text{mol PFD}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et une photopériode de 16h, à Orsay.

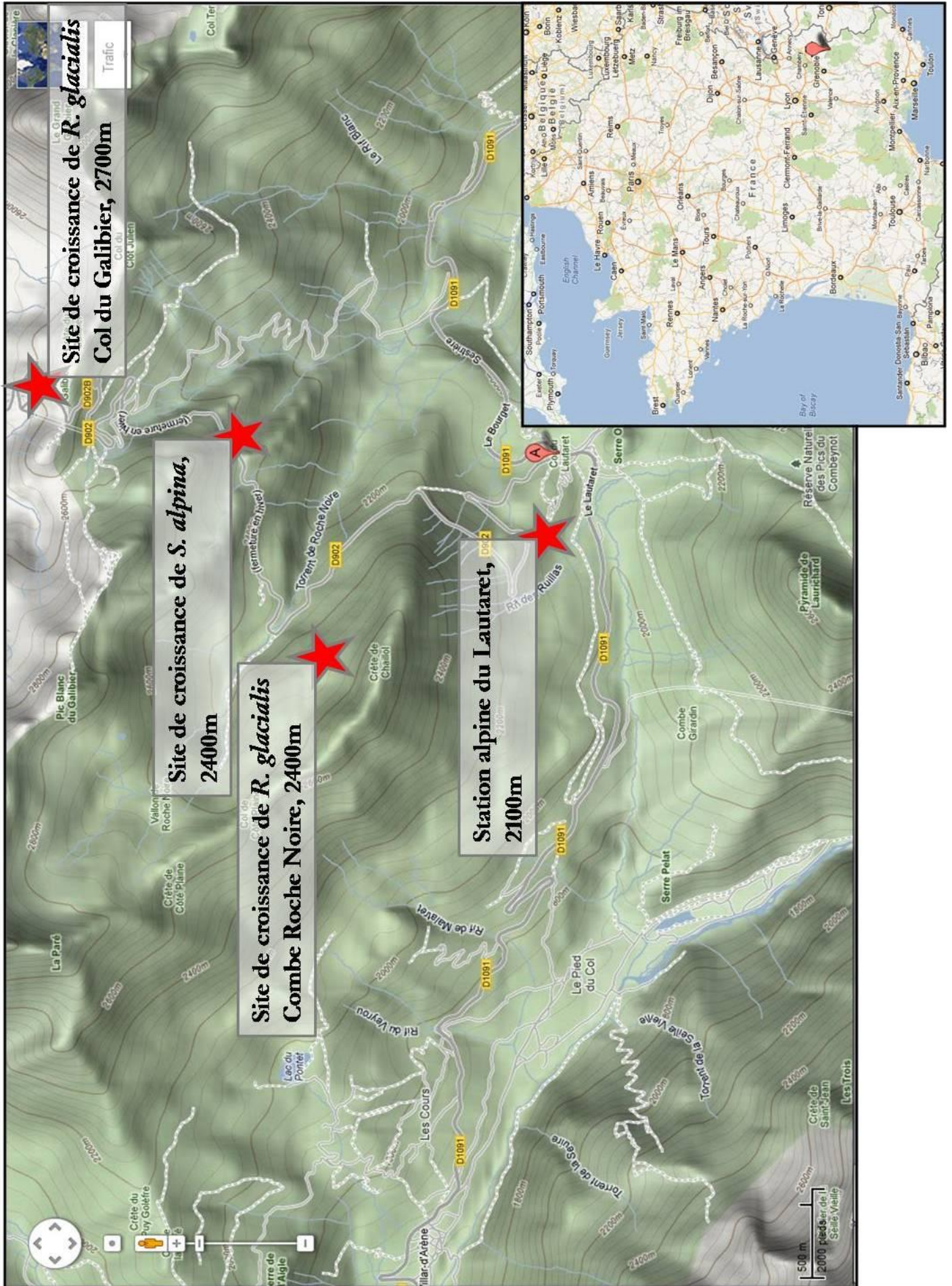
2.2 Expériences sur le matériel végétal

La Station Alpine du Lautaret est un emplacement privilégié autour duquel les espèces *Ranunculus glacialis* et *Soldanella alpina* se trouvent en abondance. Afin de déterminer si un facteur climatique pourrait induire un changement de quantité de protéine PTOX chez *Ranunculus glacialis*, nous avons cherché à obtenir un gradient de température avec l'altitude, ainsi que différentes conditions d'intensité lumineuse. Afin de mieux caractériser les activités antioxydantes et la réponse aux UV chez *Soldanella alpina*, nous

avons cherché à obtenir un gradient de température avec l'altitude, ainsi que différentes conditions d'intensité lumineuses et de rayonnement UV.



(Fig.1) La station Alpine du Lautaret est située juste au dessus du Col du Lautaret (2056 mètres d'altitude)



**Site de croissance de *R. glacialis*
Col du Galibier, 2700m**

**Site de croissance de *S. alpina*,
2400m**

**Site de croissance de *R. glacialis*
Combe Roche Noire, 2400m**

**Station alpine du Lautaret,
2100m**

(Fig.2) (Page précédente) Le site de croissance de *Ranunculus glacialis* le plus proche de la station alpine est situé à 2400 mètres d'altitude, au début d'une combe, appelée Roche Noire. Cette altitude est la plus basse pour *Ranunculus glacialis* dans cette région. Un autre site à 2400 mètres d'altitude a été défini pour *Soldanella alpina*, sur la face ubac d'une barre calcaire. A 2700 mètres d'altitude, un autre site a été défini pour *Ranunculus glacialis*.

Alors que la station alpine se trouve à 2100 mètres d'altitude environ, le site le plus proche où se trouvent des Renoncules des glaciers est situé dans une combe à neige à 2400 mètres, appelé Combe Roche Noire, facilement accessible de la route qui monte au Galibier. Sur ce site, différentes conditions d'intensités lumineuses ont été obtenues avec un ombrage artificiel. Un deuxième site a été défini, à 2700 mètres d'altitude, au dessus du Col du Galibier. Sur ce site des différences d'éclairage journalier moyen ont pu être obtenues grâce à des expositions Nord et Sud. Les plantes ont par ailleurs été cultivées dans une parcelle expérimentale à l'arrière de la station alpine, à 2100 mètres d'altitude.

La Soldanelle alpine est présente en grande quantité de 2000 à 2600 mètres, appréciant les prairies alpines et particulièrement les combes à neige. Un premier site a été défini à 2400 mètres, coté ubac d'une barre calcaire, facilement accessible depuis la route.

Les températures et intensités lumineuses ont été régulièrement suivies par des mesures de microclimat (température de l'air, des feuilles, intensité lumineuse), grâce à des Campbell CR23X et CR800.

2.2.1 2700 mètres, Col du Galibier

De part et d'autre du col du Galibier, les éboulis siliceux sont propices au développement de *Ranunculus glacialis* que l'on trouve dispersée sur de grandes étendues. Des sites orientés au Sud et au Nord ont été déterminés afin d'obtenir des plantes plus ou moins exposées à la lumière.

2.2.2 2400 mètres, Combe Roche Noire

Une communauté importante de *Ranunculus glacialis* se trouve à l'entrée de la combe Roche Noire, (+45° 3' Nord, +6° 23' Est) dans l'eau de ruissellement de névés qui fondent tard dans la saison. En fin de saison 2009, plus de 25 plantes de *Ranunculus*

glacialis ont été déterrées puis replacées en pot, afin de faciliter les mesures *in vivo* réalisées au laboratoire de la station alpine.

Des ombrages ont été placés sur la moitié des plantes en pots au début de la saison suivante, grâce à un filet de nylon (Polyéthylène Haute Densité, vert, 55% d'ombrage) fixé sur châssis à une hauteur suffisante pour permettre la libre circulation de l'air. Les ombrages ont été laissés sur le terrain les années suivantes.



(Fig.3) Des ombrages ont été installés sur une partie des plantes de *Ranunculus glacialis*, mises en pot sur leur site de croissance naturel de Combe Roche Noire à 2400 mètres. (Photo prise le 16.06.10)

2.2.3 2400 mètres, barre calcaire

Une communauté importante de *Soldanella alpina* se trouve sur la face nord-est d'une barre calcaire à l'altitude de 2400 mètres. Lors de la fonte de la neige, l'emplacement de névés qui fondent tardivement dans la saison crée un environnement favorable à *Soldanella alpina*, qui y est très abondante.

Les activités enzymatiques et les mesures de photoinhibition sont toutes réalisées avec des individus provenant de ce site.

2.2.4 2100 mètres, Station Alpine du Lautaret

Sur la parcelle expérimentale située à l'arrière de la station alpine, des plantes de *Soldanella alpina* et de *Ranunculus glacialis* sont cultivées, sous différentes conditions d'éclairement (ombrage artificiel et témoins).

2.2.5 Niveau de la mer, chambre froide d'Orsay

Depuis plusieurs années, des plantes de *Ranunculus glacialis* et *Soldanella alpina* sont cultivées en chambre froide au laboratoire d'Orsay, à faible température (6°C) et sous faible lumière (100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 24h/24). Les plantes de *Ranunculus glacialis* s'y développent tout au long de l'année, bien qu'elles soient en quantité plus importantes au printemps. Leurs apparitions aléatoires ainsi que leur fragilité ont rendu difficiles les expérimentations sur ces individus. Les plantes de *Soldanella alpina* conservent leurs feuilles pendant plusieurs années (jusqu'à quatre ans) et les nouvelles feuilles qui apparaissent en chambre froide sont plus petites et il est rare que de nouvelles plantes apparaissent.

2.3 Mesure du climat

La température (°C) des feuilles et de l'air, ainsi que l'intensité lumineuse (Photon Fluence Density, PFD, en $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) reçue par les feuilles, ont été mesurées pendant plusieurs années sur les sites de croissance sélectionnés de *Ranunculus glacialis* et *Soldanella alpina*.

La mesure de la température se fait grâce à un thermocouple (cuivre-constantin) fixé de manière à toucher la face abaxiale de la feuille ou placé sous un ombrage pour mesurer la température de l'air. La mesure de l'intensité lumineuse incidente est réalisée grâce à un capteur de PFD installé de façon à suivre l'inclinaison des feuilles mesurées.

Températures et PFD sont mesurés toutes les trente secondes, et stockés par des centrales d'acquisition Campbell CR23X ou CR800. Toutes les heures, les moyennes, maximum et minimum des températures et PFD sont exprimés.



(Fig.4) La centrale d'acquisition CR23X a été installée au dessus du col du Galibier, pour mesurer les températures de plusieurs feuilles et de l'air (le thermocouple permettant la mesure de la température de l'air est situé sous le bouchon en plastique blanc visible sur la photo), et l'intensité lumineuse reçue par les feuilles (photo prise le 28.06.11).

2.4 Fluorescence chlorophyllienne

2.4.1 Introduction

Une partie de la lumière absorbée par les antennes est perdue par réémission sous forme de chaleur et de fluorescence. A température ambiante, c'est principalement le PSII qui est responsable de l'émission de fluorescence (80 à 90% de l'émission totale) et cette émission est variable au niveau du PSII, mais pas au niveau du PSI.

Les appareils de mesure de la fluorescence chlorophyllienne sont paramétrés afin d'exciter préférentiellement le PSII : le PAM 2000 émet une lumière avec un pic à 650 nm, et cette lumière est filtrée pour les longueurs d'ondes supérieures à 670 nm (ainsi,

$\lambda < 670$), tandis ce que le fluorimètre du LiCOR émet une lumière avec un pic à 630 nm, et qui reste < 670 nm.

On estime que 2 à 3% de la lumière absorbée est ré-émise sous forme de fluorescence. On peut estimer l'émission de la fluorescence en exposant la surface de la feuille à une lumière de longueur d'onde connue et en mesurant la lumière réémise à des longueurs d'ondes plus grandes.



(Fig. 5) Exemple de mesure de la fluorescence chlorophyllienne sur le terrain, avec un mini PAM.

L'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle est transférée aux électrons de valence et cette excitation se transmet de chlorophylle en chlorophylle, dans les antennes, par résonance. Lorsque cette excitation arrive jusqu'aux chlorophylles centre (centre réactionnel, P680), un électron est transféré de la phéophytine à QA. Le P680 oxydé récupère son électron d'une tyrosine qui elle-même récupère un électron de l'eau. L'excitation qui n'est pas transmise est émise sous forme de chaleur ou de fluorescence.

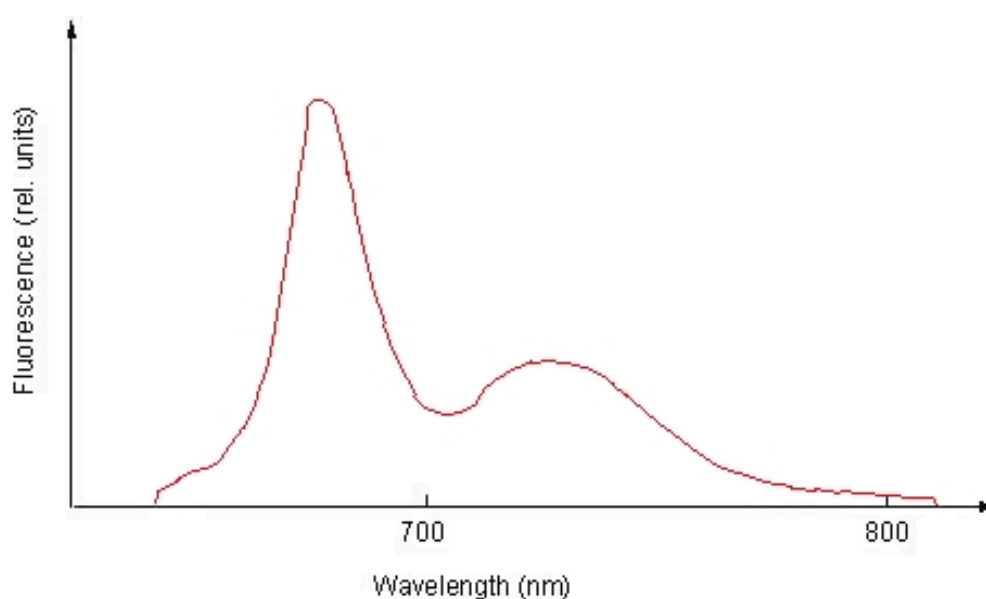
Ainsi, les électrons excités peuvent retourner à leur état initial soit par photochimie (P), soit sous forme de chaleur (D), soit sous forme de fluorescence (F). Ces trois mécanismes

étant en compétition, la mesure de la fluorescence chlorophyllienne donne des informations sur les autres processus.

On peut écrire que :

$$P + D + F = 1$$

La fluorescence produite par les feuilles est majoritairement due à la chlorophylle a et montre un maximum d'émission entre 680 et 690 nm et un épaulement vers 740 nm.



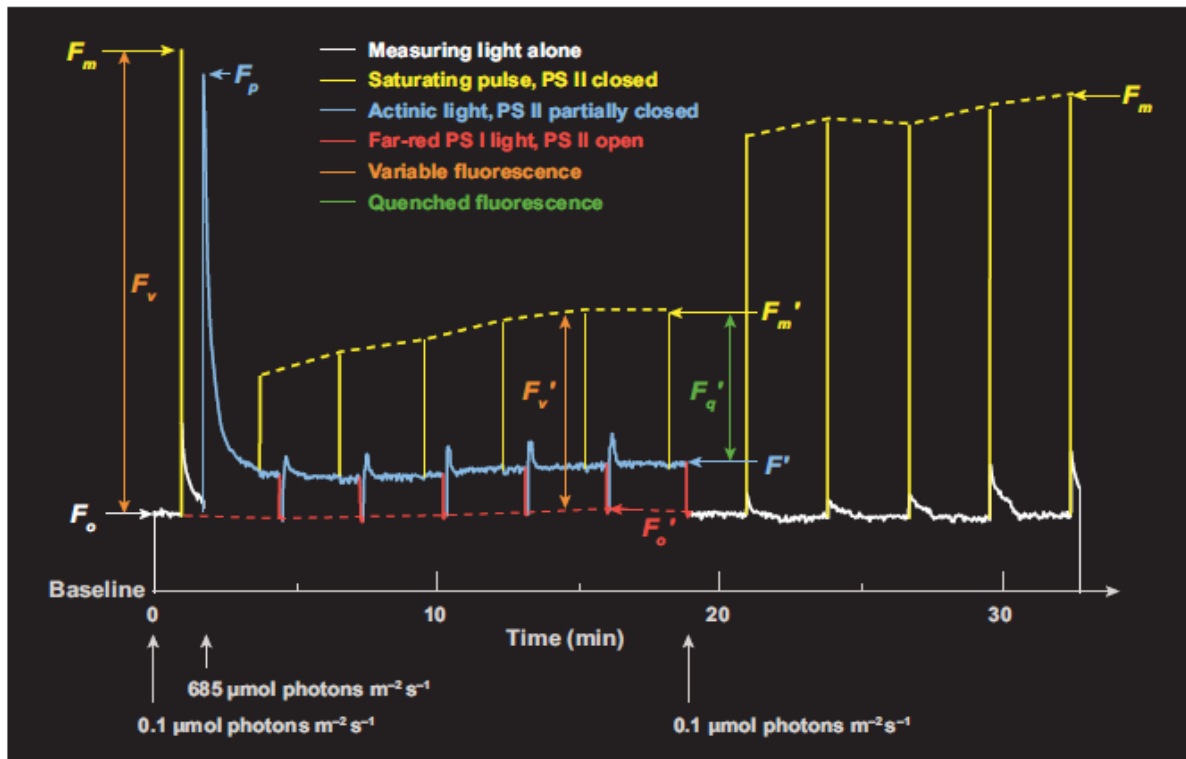
(Fig. 6) Spectre d'émission de fluorescence de feuilles (source Hansatech).

2.4.2 Le rendement quantique du PSII

En 1931, une augmentation de la fluorescence lors du transfert de la feuille à la lumière est décrite (effet Kautsky) : à la lumière, les accepteurs d'électrons du PSII (quinones) sont rapidement réduits, induisant une fermeture des centres réactionnels et conduisant à une diminution du rendement de la photochimie (P) et donc à une augmentation de la fluorescence (F) et de la dissipation de chaleur (D).

Un centre réactionnel est dit ouvert quand les accepteurs situés en aval dans la chaîne de transport d'électrons sont disponibles, en particulier les plastoquinones QA. Quand ces

accepteurs sont tous réduits, ils ne sont plus disponibles pour prendre en charge les électrons détachés au niveau du centre réactionnel, qui est alors dit fermé.



(Fig. 7) Description du quenching de la fluorescence via la fluorescence modulée (Source : Baker 2008). Une feuille adaptée à l'obscurité est exposée à différents traitements lumineux, les paramètres qui sont annotés avec un (') correspondent à la réponse d'une feuille exposée à une lumière actinique, tandis ce que les paramètres sans (') correspondent à la réponse d'une feuille adaptée à l'obscurité. Les couleurs correspondent aux différents traitements lumineux. La lumière de mesure (en blanc) correspond à une très faible intensité ($0,1 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$); la lumière saturante (en jaune) correspond à un court flash (1 à 1,5 sec) à très forte intensité ($> 6000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$); la lumière actinique permettant à la photosynthèse d'atteindre un état stationnaire (en bleu) est émise avec une intensité de $685 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; et enfin la lumière rouge sombre (entre 720 et 740 nm, pendant 4 sec), est émise à l'intensité de $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

- Pour une feuille acclimatée à l'obscurité et soumise à une très faible lumière modulée, on peut définir un niveau de fluorescence qui correspond à un état où tous les centres réactionnels PSII sont ouverts : F_o (niveau zéro de fluorescence). Pour une feuille acclimatée à l'obscurité et soumise à un flash de lumière très fort (supérieur à $6000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), on peut définir un niveau de fluorescence

qui correspond à un état où tous les centres réactionnels sont fermés : F_m (fluorescence maximum).

La fluorescence émise entre ces deux extrêmes est appelée fluorescence variable, F_v .

A l'obscurité, on peut définir le rendement quantique maximum de la photochimie du PSII, ainsi (Baker 2008):

$$\text{Rendement quantique maximum de la photochimie} = (F_m - F_o) / F_m = F_v / F_m$$

Le rendement quantique du PSII correspond à la fraction de l'énergie lumineuse utilisée par la photochimie et sa valeur maximale est généralement comprise entre 0,8 et 0,84.

- A la lumière, certains centres réactionnels sont fermés et la mesure de la fluorescence est sous ces conditions signalée par un ' F_m' ' est mesuré pendant la période d'éclairement avec un flash de lumière très fort et F_o' est mesuré pendant une période de quelques secondes sous rayonnement rouge sombre, sans rayonnement actinique, avec une très faible lumière (La lumière rouge sombre excite préférentiellement le PSI, ce qui permet la ré-oxydation du PSII).

A la lumière, le rendement quantique de la photochimie des centres ouverts du PSII, est défini par :

$$(F_m' - F_o') / F_m' = F_v' / F_m'$$

- Après un temps d'acclimatation à la lumière, un état d'équilibre est atteint entre l'excitation des centres par la lumière et leur désactivation par les réactions secondaires de la photosynthèse (fixation de l' O_2 et du CO_2 , réaction de Mehler, réduction du nitrate...). Le niveau de fluorescence mesuré dans ces conditions, avec une intensité lumineuse non saturante, correspond à cet état stationnaire de la fluorescence qui est appelé F' .

Sous ces conditions, le rendement quantique de la photochimie du PSII est défini par :

$$\Phi_{\text{PSII}} = (\text{Fm}' - \text{F}') / \text{Fm}'$$

Une corrélation forte existe entre Φ_{PSII} et Φ_{CO_2} , l'efficacité d'assimilation du CO_2 (Maxwell & Johnson 2000).

Φ_{PSII} permet aussi de déterminer le flux d'électrons passant par le PSII, et ainsi d'estimer la capacité photosynthétique totale *in vivo* (Genty et al. 1989).

2.4.3 Le quenching de la fluorescence

Le quenching de la fluorescence correspond aux processus contribuant à la diminution du rendement de la fluorescence chlorophyllienne.

- On définit le quenching photochimique (qP) comme étant une estimation de la capacité du PSII à atténuer la fluorescence, en étant capable de réaliser la photochimie (fixation O_2 et CO_2 , réaction de Mehler, réduction du nitrate...).

Le quenching photochimique est estimé par la relation suivante :

$$\text{qP} = (\text{Fm}' - \text{Fs}) / (\text{Fm}' - \text{Fo}')$$

qP décrit la proportion des centres réactionnels du PSII qui sont ouverts, ou autrement dit, la vitesse avec laquelle les électrons sont transportés en dehors du PSII en supposant que chaque centre PSII peut réduire seulement une plastoquinone A.

Cependant, la fraction des centres ouverts du PSII peut être exprimée par le paramètre qL, qui prend mieux en compte le fait que les PSII sont regroupés sous forme de radeau (Baker 2008) (modèle « paddle », où plusieurs centres PSII partagent plusieurs QA) dans les membranes des thylacoïdes :

$$\text{qL} = [(\text{Fm}' - \text{F}') / \text{F}'] / (\text{Fo}' / \text{F}')$$

- On définit le quenching non photochimique (NPQ) comme étant une estimation de la capacité du PSII à atténuer la fluorescence, en étant capable de dissiper l'énergie d'excitation sous forme de chaleur

On voit en effet que $F_m' < F_m$, donc que l'éclairement de la feuille par une lumière actinique a provoqué une atténuation de F_m . Cette atténuation n'est pas due à la photochimie puisque sous lumière saturante, les centres réactionnels sont fermés, mais à la dissipation thermique.

Le quenching non photochimique est estimé par les relations suivantes :

$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$$

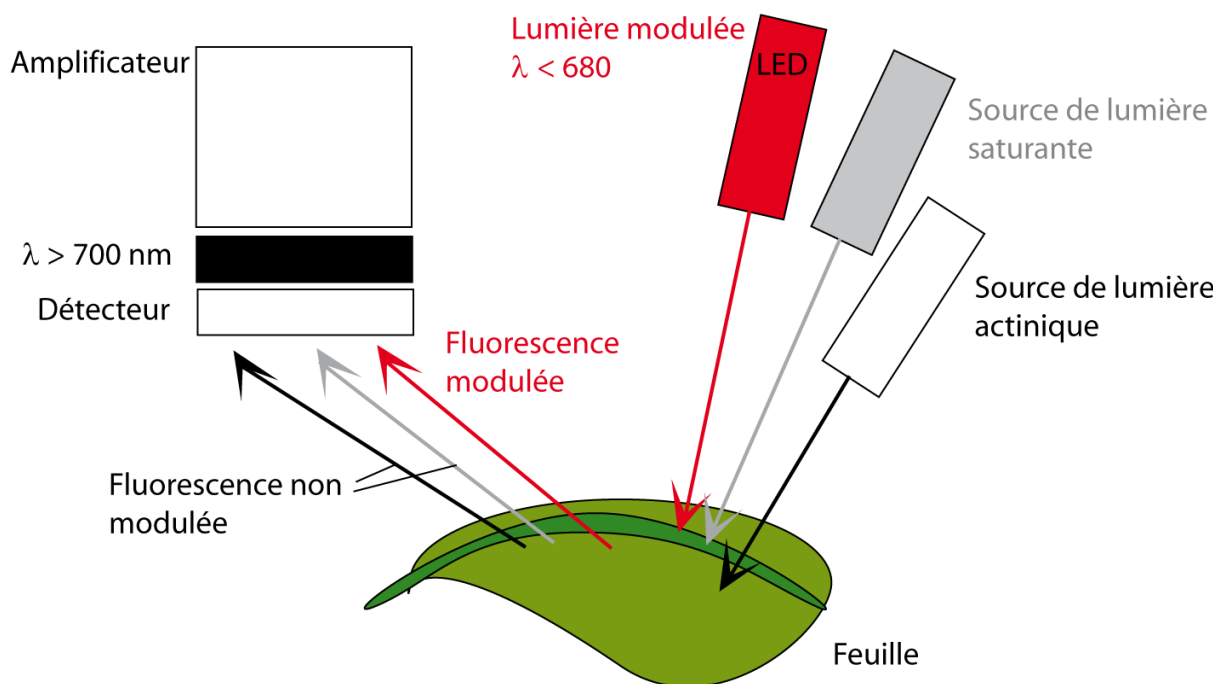
2.4.4 Mesure de la fluorescence chlorophyllienne

La fluorescence de la chlorophylle, quand elle est mesurée parallèlement aux mesures d'échanges gazeux, permet l'étude du transport des électrons dans la chaîne chloroplastique, et notamment d'estimer le flux d'électrons au niveau du PSII et la part allouée à différents processus (assimilation, respiration, photorespiration, flux alternatifs).

Dans le cas où la fluorescence chlorophyllienne est mesurée parallèlement aux échanges gazeux, un IRGA couplé à un fluorimètre est utilisé (LI6400-40, LiCOR). Dans le cas où seule la fluorescence chlorophyllienne est mesurée, un fluorimètre est utilisé (PAM 2000, MiniPAM, Walz)

Pour tous les appareils utilisés, le principe des mesures de la fluorescence reste le même (Baker 2008). Les mesures sont réalisées sur la face abaxiale de la feuille, et mettent en jeu trois types de lumière :

- une lumière analytique modulée, de faible intensité afin de ne pas modifier le rendement quantique de la photochimie
- une lumière actinique blanche d'intensité variable permettant de moduler le rendement quantique de la photochimie
- un éclair actinique de lumière blanche, de très forte intensité, qui permet de saturer la photochimie et ainsi de fermer tous les centres réactionnels



(Fig.8) Représentation schématique du principe de la mesure de la fluorescence de la chlorophylle.

Au début de l'expérimentation, les niveaux de fluorescence à l'obscurité (F_0 et F_m) sont mesurés après au minimum 30 minutes d'acclimatation à l'obscurité.

L'émission de fluorescence à la lumière est ensuite mesurée en permanence sous une lumière actinique, et durant l'acclimatation à la lumière (qui peut durer de 30 minutes à 1 heure), F' est mesuré toutes les 5 minutes (LICOR) ou en permanence (PAM) sous une lumière actinique, grâce à un flash de lumière saturant (1,5 sec) (F_m') et suivit, à l'obscurité, d'une courte période de rouge sombre (F_0').

Quand les mesures de fluorescence sont réalisées indépendamment des échanges gazeux (PAM 2000), F_m' et F_0' sont mesurés toutes les 5 minutes.

Dans le cas où les mesures de fluorescence chlorophyllienne sont réalisées en même temps que les échanges gazeux, F_m' et F_0' sont mesurés quand la réponse de la feuille aux conditions appliquées (concentration de CO_2 , intensité lumineuse) est stabilisée.

Le taux d'électrons transportés au niveau du PSII (J_T ou ETR, electron transport rate) peut être obtenu à partir du modèle proposé par Ghashghaie et Cornic (1994) ou bien à partir du modèle proposé par Krall et Edwards (1992). Ces modèles sont décrits plus loin.

2.5 Echanges gazeux

L'assimilation nette du CO₂ par les feuilles est mesurée parallèlement à la fluorescence chlorophyllienne par un analyseur de gaz à infra rouge, (IRGA Li-6400, LI-COR) équipé d'un fluorimètre (6400-40, LI-COR).

2.5.1 Mesure des échanges gazeux

Au niveau de la feuille, les échanges gazeux correspondent à un flux sortant de vapeur d'eau qui est lié à la transpiration, d'une part, et à des flux d'O₂ et de CO₂ qui sont liés aux processus de la photosynthèse et de la respiration, d'autre part.

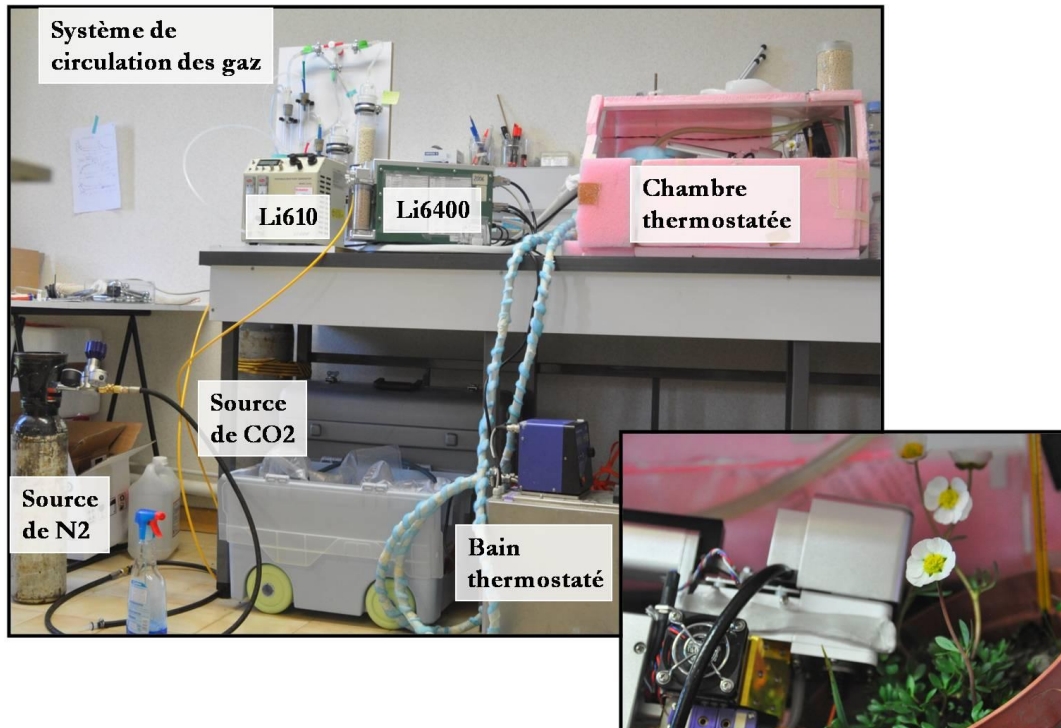
Les mesures d'échanges gazeux reposent sur le fait que la vapeur d'eau et le CO₂ absorbent dans l'infrarouge, à différentes longueurs d'ondes.

Lors de la mesure, la feuille est placée dans une chambre fermée d'une surface de 2 cm², balayée par un flux d'air dont le débit et les pressions partielles en CO₂ et H₂O sont contrôlées. La température du système et l'intensité lumineuse peuvent être finement réglés.

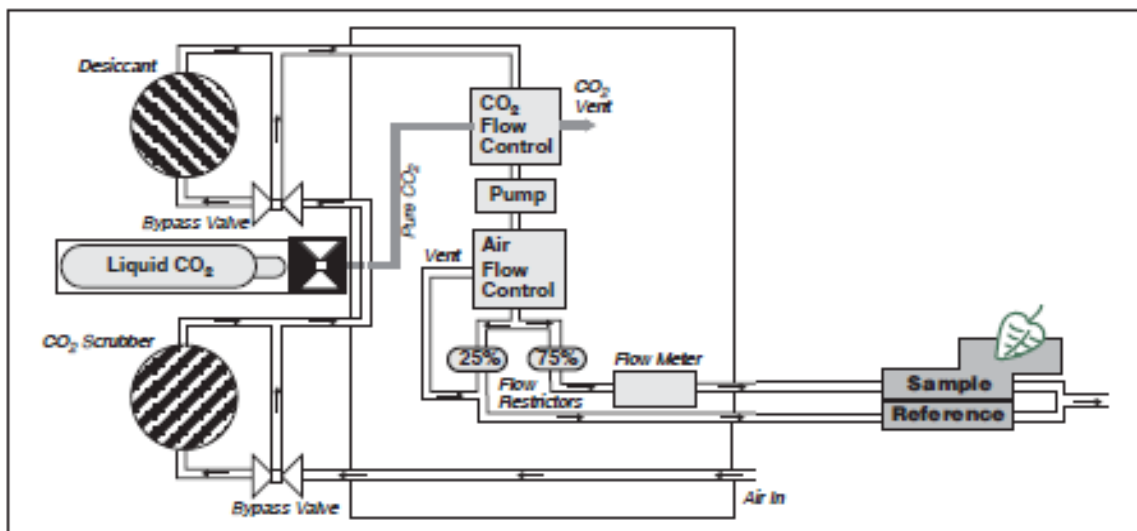
Les mesures de photosynthèse (ou de respiration à l'obscurité) et de transpiration sont basées sur des différences de concentration de CO₂ et H₂O à l'entrée et à la sortie de la chambre accueillant la feuille.

Ainsi, les valeurs obtenues par cette mesure concernent les concentrations en CO₂ dans la chambre et des concentrations contrôle, les concentrations en vapeur d'eau dans la chambre et des concentrations contrôle, la température de l'air et de la feuille et le débit d'air.

La chambre de mesure est maintenue dans un caisson en plexiglas fermé pour conserver une température stable et éviter des différences de concentrations de CO₂ trop importantes entre le flux d'air mesuré et l'air extérieur.



(Fig.9) La chambre de mesure du Li-6400 (grossissement) est placée dans un caisson thermostaté, relié à un bain thermostaté. Les gaz entrant dans le système proviennent soit de bouteilles (CO₂, et 1% O₂ pour obtenir une atmosphère pauvre en O₂), soit de l'air ambiant (pour obtenir une concentration atmosphérique d'O₂ et N₂) et l'humidité de l'air entrant dans le système est ajustée par un Li-610.



(Fig.10) Schéma de la circulation des gaz dans le Li6400 (Source : Licor, manuel d'utilisation du Li6400, V5)

Par ailleurs, ce caisson est parcouru par un système de circulation associé à un bain thermostaté, permettant à un liquide de refroidissement (éthylène glycol) de maintenir stable la température de l'air environnant et de faire des mesures à des températures extrêmes (de 10 à 35°C).

En effet, la pince de mesure du Li-6400 ne pouvant s'écarter de plus de 5°C de la température de l'air extérieur, il devient nécessaire de modifier celle-ci lorsque les mesures ne s'effectuent plus dans une gamme de températures correspondant à celle de l'air ambiant.

Afin de contrôler l'humidité de l'air (notamment pour éviter la condensation sous des températures éloignées de celle de l'air ambiant) et afin de faire des mesures sous différentes conditions atmosphériques, l'air circule à travers un ensemble de filtres avant d'arriver dans l'IRGA.

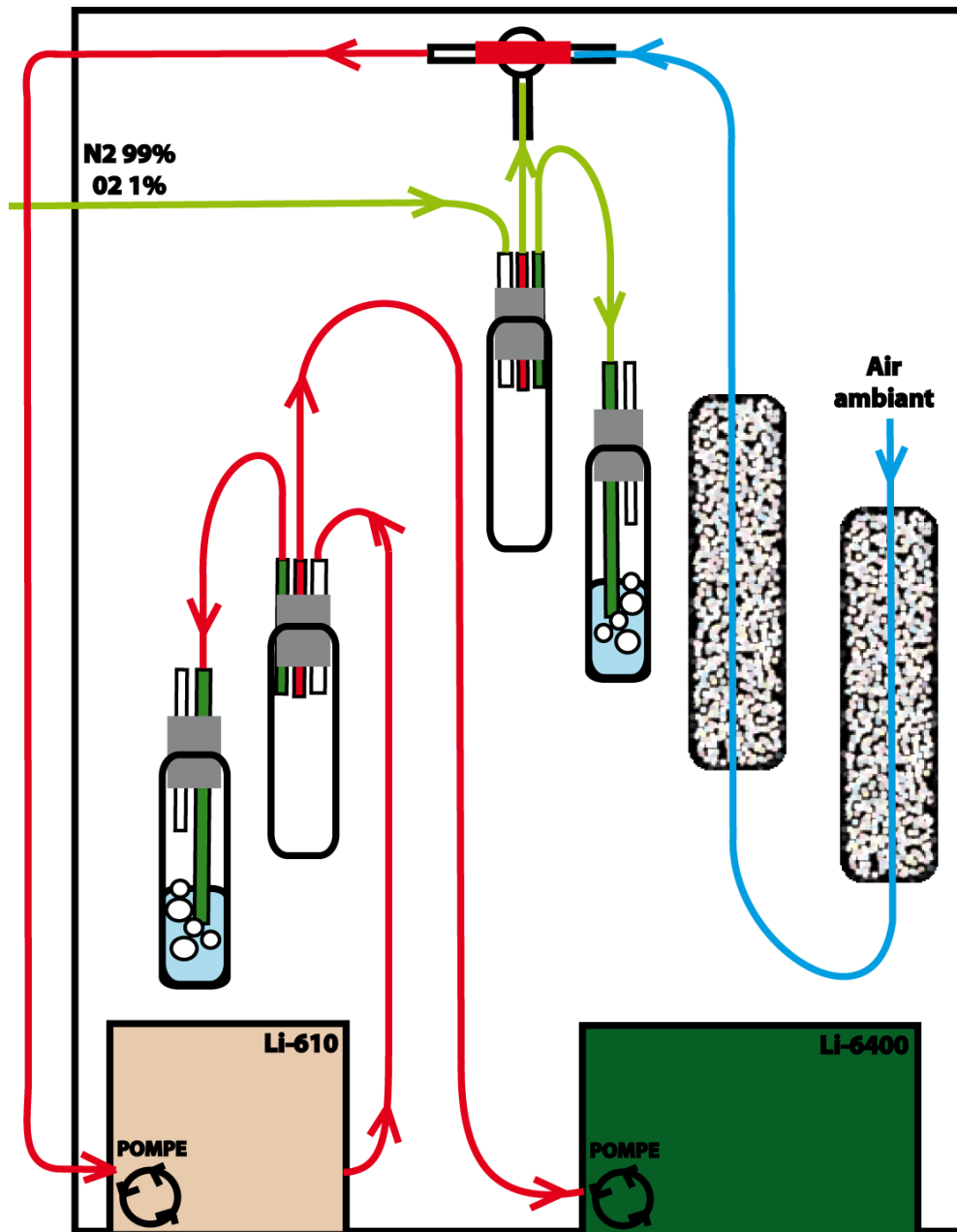
L'air ambiant, débarrassé de son CO₂ grâce à un passage dans deux colonnes de chaux sodée, est pompé par un générateur de point de rosée (Li-610, LI-COR). Le passage par le générateur de point de rosée permet d'obtenir un déficit de pression de vapeur d'eau foliaire autour d'1 kPa.

L'air venant du générateur de point de rosée est mélangé à du CO₂ provenant d'une source extérieure, au niveau de la console du Li-6400 et le mélange est dirigé vers la chambre de mesure.

Dans le cas où c'est l'air ambiant qui est pris en charge par le système d'échanges gazeux, le CO₂ est filtré et l'O₂ est à la concentration atmosphérique, 21%.

Pour obtenir des conditions avec des concentrations en O₂ presque nulles, un mélange de gaz (N₂ 99%, O₂ 1%) est injecté dans le système.

Un système de bulleur permet de vérifier que la fourniture en gaz correspond au volume pompé, afin d'éviter d'endommager les pompes.



(Fig.11) Représentation schématique du système de circulation des gaz entrant dans l'IRGA. Li6400 : IRGA ; Li-610 : générateur de point de rosée ; colonnes noires et blanches : chaux sodée filtrant le CO_2 contenu dans l'air ; bulleirs : contrôle de pression dans le système.

Les concentrations en CO_2 et H_2O sont mesurées à l'entrée de la chambre de mesure (référence) et à la sortie (chambre).

Au début de la mesure, la feuille placée dans la chambre d'assimilation est acclimatée à l'obscurité pendant au moins 30 minutes, afin de mesurer la respiration à l'obscurité, R_d (dark Respiration), sous des concentrations atmosphériques de CO_2 et O_2 . Quand la valeur

de la respiration à l'obscurité est stabilisée, la feuille est acclimatée à la lumière (300 ou 750 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10% de lumière bleue) afin d'induire la photosynthèse et atteindre un état stationnaire, à nouveau sous des concentrations atmosphériques de CO_2 et O_2 . Cette étape dure 30 min à 1h environ.

2.5.2 Réponse de l'assimilation nette de CO_2 au flux quantique

La feuille est soumise à un programme permettant de faire varier le flux quantique, avec un pas de temps suffisamment long (5 à 7 min) pour obtenir un signal stable pour les concentrations en H_2O et CO_2 entrant et sortant de la chambre.

Les intensités lumineuses appliquées sont les suivantes ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) :

300, 200, 100, 50, 300, 300, 300, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 750, 750

Tout au long du programme, la concentration en CO_2 de l'air arrivant dans la chambre est maintenue soit à 380 ppm, soit à 2 000 ppm, suivant que l'on souhaite une concentration en CO_2 atmosphérique ou saturante, respectivement.

La concentration en O_2 de l'air arrivant dans la chambre est maintenue soit à 21% (210 000 ppm), soit à 0.5% (5 000 ppm), suivant que l'on souhaite une concentration en O_2 atmosphérique ou proche de 0, respectivement.

Pour chaque modification des concentrations en CO_2 ou O_2 , la feuille est acclimatée pendant au moins 15 minutes (sous 750 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$), jusqu'à obtention d'un signal stable pour les concentrations en H_2O et CO_2 entrant et sortant de la chambre.

2.5.3 Réponse de l'assimilation nette de CO_2 à la concentration de CO_2 dans l'air

La feuille est soumise à un programme permettant de faire varier la concentration en CO_2 de l'air arrivant dans la pince (C_a), avec un pas de temps suffisamment long (5 à 7 min) pour obtenir un signal stable pour les concentrations en H_2O et CO_2 entrant et sortant de la chambre.

L'intensité lumineuse incidente utilisée pour ce programme correspond à l'intensité lumineuse moyenne reçue par les plantes sur le site de croissance à 2400 mètres, par jour : $750 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

Lors du programme, les concentrations en CO_2 appliquées sont les suivantes (ppm) : 380, 200, 100, 50, 380, 380, 380, 500, 750, 1000, 1250, 2000, 380, 380, 380

Tout au long du programme, la concentration en O_2 de l'air arrivant dans la chambre est maintenue soit à 21% (210 000 ppm), soit à 0.5% (5 000 ppm), suivant que l'on souhaite une concentration en O_2 atmosphérique ou proche de 0, respectivement.

Classiquement, les résultats sont représentés sous forme d'une courbe $A_n = f(C_i)$, C_i représentant la concentration en CO_2 dans les espaces intercellulaires, et non $A_n = f(C_a)$, afin de tenir compte des étapes de limitation à la diffusion du CO_2 dues à la cuticule et aux stomates.

2.5.4 Electrode à O_2

L'évolution de l' O_2 est suivie sur des feuilles intactes avec une électrode à oxygène (Hansatech, chambre LD2).

La température de la chambre est contrôlée par un circuit d'eau relié à un bain thermostaté.

Les mesures sont réalisées sous une lumière maximale de $900 \mu\text{mol PFD m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, et sous une concentration saturante en CO_2 (Streb et al. 1997).

Le signal correspondant à 21% O_2 est calibré pour chaque nouvelle mesure par l'injection d'1 mL d'air ambiant dans la chambre, et la réponse de photosynthèse à la lumière est estimée après une mesure de la respiration à l'obscurité.

2.6 Estimation des flux d'électrons vers le CO₂ et l'O₂

2.6.1 Estimation du flux d'électrons au niveau du PSII et du rendement quantique de l'assimilation du CO₂

Les données obtenues à l'issue de la mesure (principalement l'assimilation nette de CO₂, la transpiration, et la conductance stomatique) sont calculées en utilisant le modèle de von Caemmerer et Farquhar (1981) en considérant la surface projetée de la feuille.

- Les mesures de fluorescence chlorophyllienne permettent d'estimer le flux linéaire d'électrons au niveau des PSII, J_T , selon la description publiée par Krall et Edwards (1992) :

$$J_T = \Phi_{PSII} * PFD * I * a$$

PFD (Photon Flux Density) est l'intensité lumineuse incidente ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

I représente la répartition de l'énergie incidente entre le PSI et le PSII et est égale à 0,5
a est le coefficient d'absorbance de la feuille

Dans le cas où les mesures de fluorescence ne sont pas à associées à des mesures d'échanges gazeux, (PAM 2000), cette relation est utilisée pour estimer le flux d'électrons au niveau du PSII.

Dans ces conditions, ce sont principalement les mesures de photoinhibition et d'inhibition du transport électroniques qui ont été réalisées.

- Les mesures d'échanges gazeux foliaires permettent d'estimer le rendement quantique de l'assimilation du CO₂, Φ_{CO_2} :

$$\Phi_{CO_2} = (A_n - R_l) / PFD * a$$

A_n est l'assimilation nette du CO₂, exprimée en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

R_l est la respiration à la lumière, exprimée en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Voir paragraphe suivant)

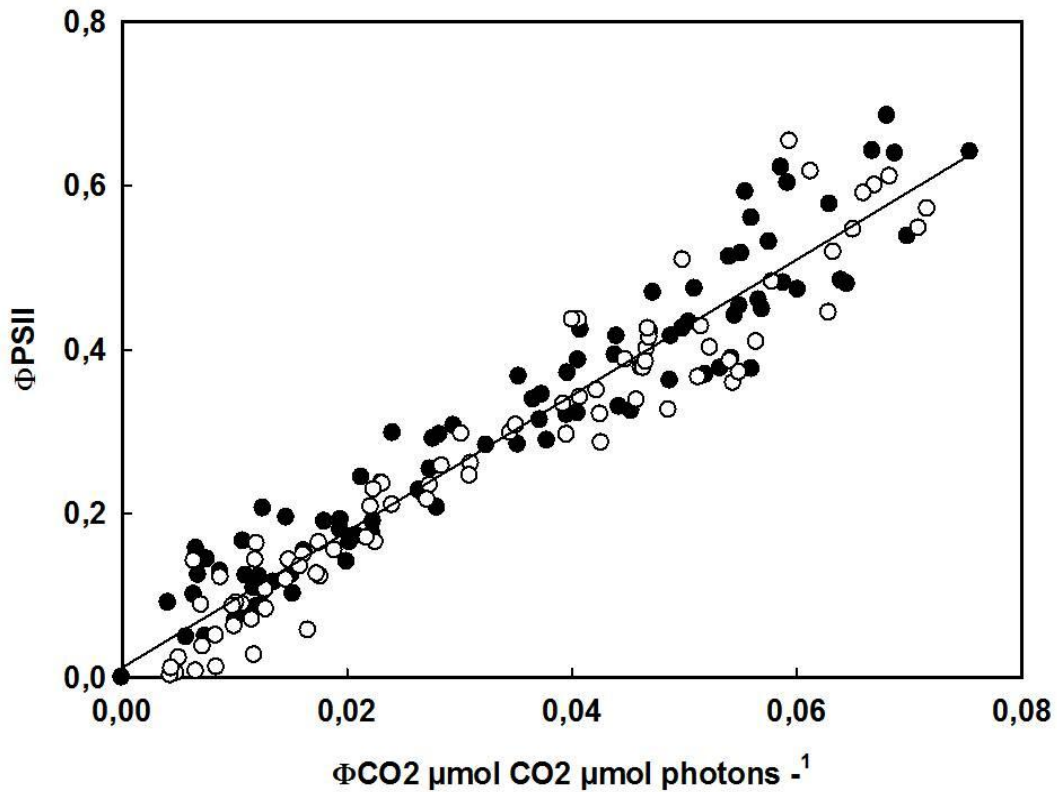
Cette relation permet d'estimer le flux linéaire d'électrons au niveau des PSII, J_T , selon la description publiée par Ghashghaie & Cornic (1994) :

$$J_T = \Phi_{CO_2} * PFD * 4$$

J_T ainsi est estimé à partir de la relation entre Φ_{PSII} et Φ_{CO_2} , mesurés en conditions non photorespiratoires (dans 1% O_2), sous lesquelles la grande majorité des électrons venant du PSII servent à la réduction du CO_2 .

Il y a une relation linéaire entre Φ_{PSII} et Φ_{CO_2} , quelques soient les conditions d'éclairement ou de concentration de CO_2 dans l'air ambiant.

Dans ces conditions, ce sont principalement les mesures permettant d'estimer la consommation des électrons par l'assimilation du CO_2 , la photorespiration, et la consommation d' O_2 alternative qui ont été réalisées.



(Fig.12) Relation entre le rendement quantique de l'assimilation du CO₂ (Φ_{CO_2}) et le rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) dans un air contenant 1% d'O₂, pour des plantes de *Ranunculus glacialis* cultivées à l'ombre (cercles noirs) et à la lumière (cercles blancs), à 2400 mètres. Ces données proviennent de courbes de réponse à la lumière et de courbes de réponse au CO₂.

La relation suivante a ainsi été mesurée chez *Ranunculus glacialis*:

$$- \quad \Phi_{PSII} = 8.3028 * \Phi_{CO_2} + 0.0121$$

2.6.2 Estimation de la respiration à la lumière

La mesure de la respiration à la lumière est rendue relativement compliquée par la présence de la photorespiration et de la photosynthèse qui masquent les échanges d'O₂ et CO₂ dus à la respiration mitochondriale. Plusieurs méthodes permettent de mesurer la respiration à la lumière avec un système d'échanges gazeux.

A la lumière, les échanges gazeux au niveau de la feuille peuvent être décrits ainsi :

$$A_n = A - R_i - R_l$$

A_n étant la photosynthèse nette (A_n est la valeur donnée par l'IRGA), A est la photosynthèse brute (A correspond à l'assimilation nette de CO₂ donnée par l'IRGA additionnée du CO₂ directement consommé par la photorespiration et la respiration mitochondriale), R_i correspond à la photorespiration et R_l à la respiration mitochondriale à la lumière.

La première méthode d'estimation de la respiration mitochondriale a été publiée par Kok (Kok, 1948). Elle est basée sur l'effet inhibiteur de la lumière sur la respiration, à partir d'une courbe de réponse d'A_n à la lumière incidente, sous de faibles intensités. Alors que les intensités lumineuses augmentent, la pente d'A_n présente de façon générale une diminution importante. L'extrapolation linéaire de cette pente jusqu'au point de lumière 0 indique la valeur de la respiration à la lumière, R_l, tandis ce que la même extrapolation linéaire de la pente la plus forte correspondant aux plus faibles intensités lumineuse indique la valeur de la respiration à l'obscurité, R_n (R night).

La méthode de Laisk (Laisk, 1977) est basée sur la considération que l'intensité lumineuse altère la photosynthèse et la photorespiration, mais pas la respiration mitochondriale. Des courbes de réponse d'A_n à la concentration intercellulaire de CO₂ (c_i) sont réalisées à différentes intensités lumineuses incidentes : avec des intensités lumineuses décroissantes, la pente de réponse de A_n à c_i diminue, mais si R_l ne change pas, toutes ces courbes doivent converger à un seul point (c*) qui correspond au point de compensation en absence de R_l (Γ*) sur l'axe des abscisses, et à R_l sur l'axe des ordonnées.

La méthode de Peisker (2001), en utilisant plusieurs feuilles montrant une variabilité de concentration de CO₂ aux points de compensation (Γ), de résistance intracellulaire (r) et de respiration à l'obscurité (R_n), permet d'obtenir une valeur moyenne de R_l par la régression linéaire entre Γ et le produit r*R_n. Cette méthode nécessite toutefois un champ de variation important de valeurs de Γ.

Nous avons choisi d'estimer la respiration mitochondriale à la lumière (*RI*) selon la méthode de Laisk (1977) qui nécessite des mesures à plusieurs intensités lumineuses et permet ainsi de s'approcher des conditions naturelles de croissance.

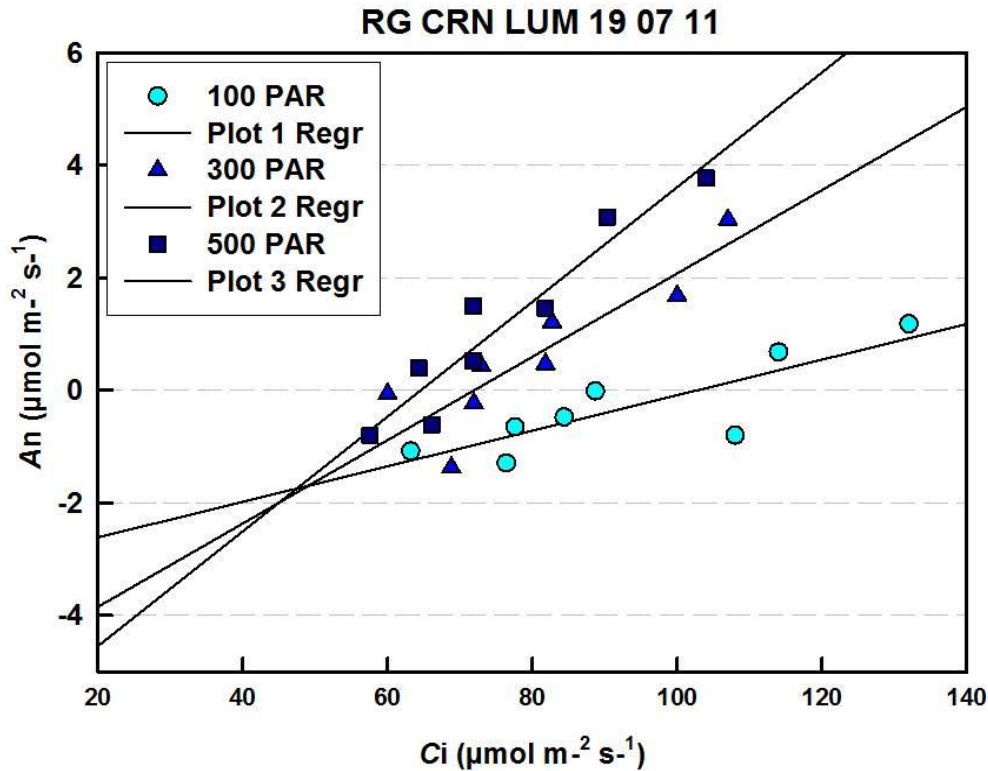
La feuille est soumise à un programme permettant de faire varier la concentration en CO₂ de l'air arrivant dans la pince (*C_a*), sous différentes intensités lumineuses incidentes. Le pas de temps est suffisamment long (5 à 7min) pour obtenir un signal stable pour les concentrations en H₂O et CO₂ entrant et sortant de la chambre.

Lors du programme, les concentrations en CO₂ appliquées pour obtenir de faibles *c_i* sont les suivantes (ppm) :

380, 150, 100, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 380 ppm

Ces courbes de réponse aux faibles *c_i* ont été réalisées avec les intensités lumineuses incidentes suivantes ($\mu\text{moles PFD m}^{-2} \text{ s}^{-1}$):

100, 300 et 500



(Fig.13) Réponse de l'assimilation nette (A_n) à la concentration intercellulaire de CO_2 (c_i), sous 100, 300 et 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dans 21% O_2 chez *R. glacialis* (site Combe Roche Noire, 2400 mètres, conditions de lumière = ensoleillement naturel). Ici, R_l est estimée à $1,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, soit 66% de R_n .

Le point d'intersection obtenu entre ces trois courbes, c^* , nous donne la concentration intercellulaire en CO_2 , Γ^* (en abscisse) pour laquelle l'assimilation nette est égale à R_l (en ordonnée).

2.6.3 Estimation de la photorespiration

Le flux linéaire d'électrons au niveau des PSII, J_T , est aussi exprimé comme étant le flux total d'électrons de la chaîne de transfert, J_T .

Selon Valentini (1995), J_T peut être divisé en deux parties, correspondant aux activités de carboxylation de la Rubisco (J_C), et d'oxygénation de la Rubisco (J_O).

En supposant la photorespiration et l'assimilation sont en compétition pour ces électrons venant du PSII, nous pouvons écrire:

$$J_T = (J_C + J_O)$$

Comme quatre électrons sont nécessaires à la réalisation d'un cycle de carboxylation et d'oxygénation, et qu'une molécule de CO₂ est dégagée tous les deux cycles d'oxygénation par la décarboxylation de deux molécules de glycine au cours de la photorespiration (Laing et al., 1974), le flux d'électrons dirigé vers les réactions de carboxylation de la Rubisco peut s'exprimer sous la forme suivante:

$$J_C = (4A_n + 0,5 J_O + 4R_l)$$

En combinant ces équations, une estimation des flux d'électrons dirigés vers le CO₂ ou l'O₂ est faite à partir du flux total d'électrons (J_T), de l'assimilation nette de CO₂ et de la respiration à la lumière (Valentini et al. 1995) :

$$J_C = 1/3 [J_T + 8(A+R_l)]$$

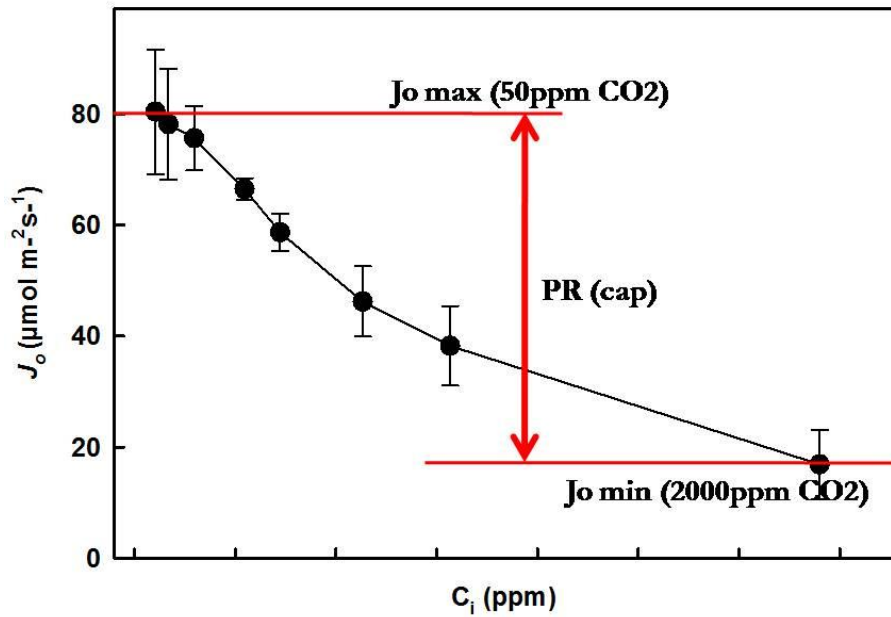
et

$$J_O = 2/3 [J_T + 4(A+R_l)]$$

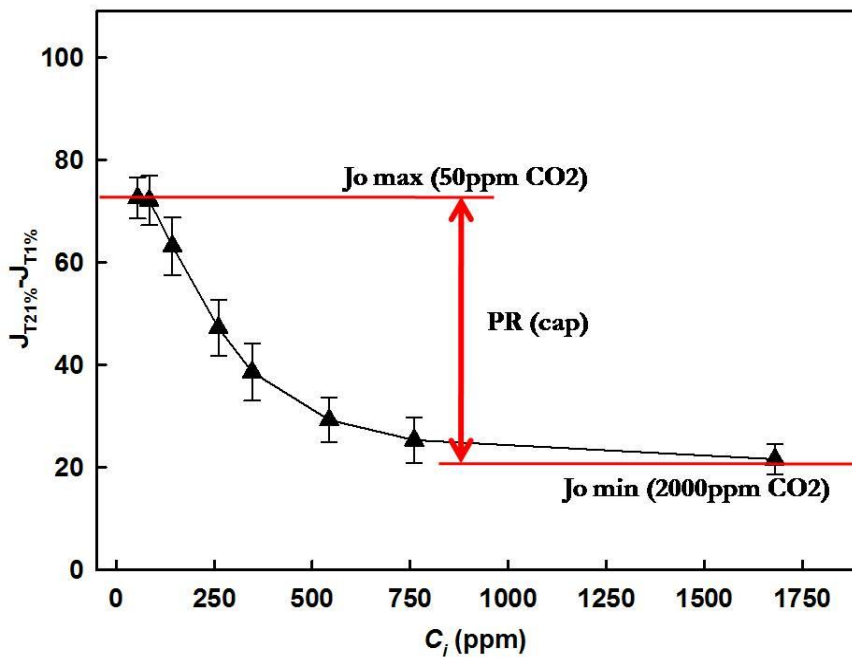
A fort CO₂ (2000 ppm), la photorespiration est complètement inhibée (cela est facilement vérifiable en observant que l'assimilation du CO₂ dans 21% O₂ et dans 1% O₂ est identique), et dans des conditions de très faibles concentrations en CO₂ (50 ppm), on peut supposer que l'activité photorespiratoire est maximale.

En considérant donc que la photorespiration est maximale sous 21% O₂, 50 ppm CO₂, et supprimée soit sous 21% O₂, 2000 ppm CO₂, soit sous 0,1% O₂ quelque soit la concentration de CO₂, il est possible de faire une estimation de la capacité de la photorespiration en faisant la différence entre J_O max (21% O₂, 50 ppm CO₂), et J_O min (21% O₂, 2000 ppm CO₂ ou 0,1% O₂).

Alors, la capacité de la photorespiration peut être estimée selon ces deux méthodes :



- 1) (Fig.14) $PR_{cap} = J_o \text{ max (21\% O}_2, 50 \text{ ppm CO}_2 \text{ air ambient, } 750 \mu\text{mol PFD m}^{-2} \text{ s}^{-1}) - J_o \text{ min (21\% O}_2, 2000 \text{ ppm CO}_2 \text{ air ambient, } 750 \mu\text{mol PFD m}^{-2} \text{ s}^{-1})$



- 2) (Fig.15) $PR_{cap} = J_T \text{ 21-1\% O}_2 \text{ min (} 50 \text{ ppm CO}_2 \text{ air ambient, } 750 \mu\text{mol PFD m}^{-2} \text{ s}^{-1}) - J_T \text{ 21-1\% O}_2 \text{ max (2000 ppm CO}_2 \text{ air ambient, } 750 \mu\text{mol PFD m}^{-2} \text{ s}^{-1})$

La capacité de la photorespiration est par ailleurs limitée par les activités enzymatiques qui lui sont associées : la glycolate oxydase est une enzyme qui intervient dans le peroxyosome, et est responsable de la catalyse de la réaction d'oxydation du glycolate en glyoxylate.

En considérant que l'oxydation d'une molécule de glycolate peut nécessiter jusqu'à 6 électrons, (Streb et al. 2005), il est possible d'estimer la capacité de la photorespiration à partir de la mesure de l'activité maximale de la photorespiration.

2.6.4 Estimation du flux d'électrons vers l'oxygène alternatif à la photorespiration

A partir des mesures d'échanges gazeux associées à des mesures de fluorescence chlorophyllienne

Quand J_T est mesuré dans des conditions non photorespiratoires (21% O_2 , 2000 ppm CO_2 ou 0,1% O_2), on observe qu'un flux d'électrons, qui n'est pas lié à la photorespiration, persiste vers l' O_2 .

L'estimation de ce flux alternatif d'électrons vers l' O_2 peut être obtenue par

1) (A faible C_i)

$$J_T \text{ excès} = J_o \text{ max (21\% } O_2, 50 \text{ ppm } CO_2 \text{ air ambiant, } 750 \mu\text{mol PFD m}^{-2} \text{ s}^{-1}) - PR_{\text{cap}}$$

2) (A fort C_i)

$$J_T \text{ excès} = J_T \text{ 21\% } O_2 \text{ max (2000 ppm } CO_2 \text{ air ambiant, } 750 \mu\text{mol PFD m}^{-2} \text{ s}^{-1}) - J_T \text{ 1\% } O_2 \text{ max (2000 ppm } CO_2 \text{ air ambiant, } 750 \mu\text{mol PFD m}^{-2} \text{ s}^{-1})$$

A partir des mesures de fluorescence chlorophyllienne associées à l'inhibition du transport électronique du niveau du cytb6/f par le DBMIB

En présence de DBMIB, le transport des électrons venant du PSII est inhibé au niveau du coté accepteur du cytochrome b6/f. Dans ces conditions, aucun flux d'électron n'est destiné à l'assimilation du CO₂ ou à la photorespiration, et si un flux persiste au niveau du PSII, il correspond à un transport alternatif prenant place avant le cyt b6/f.

Ainsi, le transport alternatif d'électrons vers l'O₂ médié par la PTOX peut être estimé en présence de DBMIB par des mesures de fluorescence chlorophyllienne permettant d'estimer le flux linéaire d'électrons au niveau du PSII, (Krall et Edwards, 1992) :

$$J_T = \Phi_{PSII} * PFD * I * a$$

2.7 Western blots

2.7.1 Préparation de protéines insolubles (adapté de Josse, 2003)

Le matériel végétal (feuilles, 0,3 à 0,5 g) est coupé et congelé dans l'azote liquide directement sur le lieu de croissance ou après manipulation (échange gazeux, mesure de fluorescence), puis gardé congelé jusqu'à utilisation.

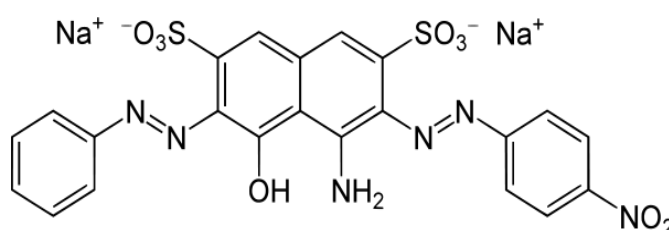
Le matériel végétal est longuement broyé dans l'azote liquide jusqu'à obtention d'une très fine poudre, qui est resuspendue dans un volume adéquat (1 à 3 ml) de tampon 1 (sucrose 10% w/v, Tris-HCl 100 mM, pH 8, βmercaptoéthanol 0,2% v/v, Pefablock 500 μM, NaCl 150 mM) et agitée pendant 20 min à 4°C.

Après centrifugation (20 min, 10 000 g, 4°C), le culot contenant les protéines insolubles est alors repris dans un volume adéquat (200 à 600 μl) de tampon 2 (sucrose 10% w/v, Tris-HCl 100 mM, pH 8, βmercaptoéthanol 0,2% v/v, SDS 1% w/v, Triton X100 1% v/v), et agité pendant 20 min à température ambiante, puis à nouveau centrifugé (20 min, à 10 000 g, 20°C).

Le surnageant contient alors les protéines insolubles et membranaires. Les protéines sont dosées et congelées jusqu'à utilisation.

2.7.2 Dosage des protéines

Pour déterminer les concentrations en protéines, un colorant pour acide aminé diazoïque est utilisé, l'Amido Black Assay. Ce colorant bleu foncé forme un complexe colorant-protéine insoluble. Après fixation, le colorant est solubilisé avec NaOH et le contenu en protéines est déterminé par spectrométrie à 615 nm.



(Fig.16) (4-Amino-5-hydroxy-3-[[4-nitrophenyl]azo]-6-phenylazo)-2,7-Naphthalene disulfonic acid, disodium salt)

Une petite quantité d'extrait de protéines (10 μL) est dissoute dans 190 μL d'eau distillée afin d'obtenir 200 μL de volume final dans un tube Eppendorf.

800 μL de solution Amido Black (Amido Black 0,5%, MetOH 90%, Acide Acétique 10% v/v) sont alors ajoutés et les tubes sont longuement agités (vortex), puis centrifugés (10min, 10 000g, 10°C).

Le surnageant est retiré précautionneusement avec une pipette Pasteur, et 800 μL de solution de rinçage (MetOH 90%, Acide Acétique 10% v/v) sont ajoutés, et les tubes sont agités, puis centrifugés (10min, 10 000g, 10°C). Le rinçage est répété.

NaOH 0,2N (1 mL) est finalement ajouté au culot rincé, les tubes sont agités et laissés à température ambiante pendant 5 min. Après une nouvelle agitation, les échantillons sont mesurés à 615 nm contre un blanc de NaOH 0,2N.

2.7.3 Electrophorèses

40 à 60 mg de protéines sont séparées par SDS-PAGE en conditions dénaturantes (Laemmli 1970).

Elles migrent successivement dans un gel de concentration à 3% de polyacrylamide (0,1% SDS), puis dans un gel de séparation à 12% de polyacrylamide (0,1% SDS), dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris, 192 mM glycine), pendant 1h, sous 150V.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Whatman) par électrophorèse dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol v/v), pendant 1h10, sous 400 mA.

Après transfert, les membranes de nitrocellulose sont saturées avec dans une solution de lait écrémé à 5% (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,9% w/v, lait écrémé 5% w/v, Tween 0,1% v/v) pendant 1 h à température ambiante ou une nuit à 4°C, puis incubées en présence des anticorps.

2.7.4 Immunodétection

Les membranes sont incubées en présence de l'anticorps primaire pendant 1h30 à 2h, dans un sachet en plastique soudé, sous faible agitation.

- L'anticorps anti-PTOX (PTOX d'*Arabidopsis thaliana*) a été aimablement fourni par Marcel Kuntz (Laboratoire Physiologie Cellulaire & Végétale, CEA, Grenoble) et a été utilisé pour les plantes alpines au 1/2000^{ème}.

- L'anticorps anti-Ndh H, aimablement fourni par Dominique Rumeau (Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire des Plantes, CEA, Cadarache) est utilisé au 1/3000^{ème}.

- L'anticorps anti FNR, aimablement fourni par Anja Krieger (Laboratoire Bioénergétique Moléculaire et Photosynthèse, CEA, Saclay), est utilisé au 1/3000^{ème}.

- L'anticorps anti CP43 (Agrisera), qui est utilisé comme contrôle de charge, est utilisé au 1/3000^{ème} selon les recommandations du fournisseur.

- L'anticorps anti psaB (Agrisera), qui est utilisé comme contrôle de charge, est utilisé au 1/1000^{ème} selon les recommandations du fournisseur.

Les membranes sont rincées 5*10 min dans un tampon de rinçage (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,9% w/v, lait écrémé 0,1% w/v, Tween 0,1% v/v)

Les membranes sont alors incubées en présence de l'anticorps secondaire pendant 45min, dans un sachet en plastique soudé, sous faible agitation. L'anticorps secondaire contre le Lapin et couplé à la peroxydase HRP, (Agrisera) est utilisé au 1/2000^{ème}.

Les membranes sont rincées 3*5min dans un tampon de rinçage (Tris-HCl 20mM, pH 7,4, NaCl 0,9% w/v, lait écrémé 0,1% w/v, Tween 0,1% v/v), puis 2*5min dans le tampon de rinçage sans lait (Tris-HCl 20mM, pH 7,4, NaCl 0,9% w/v), et elles sont finalement rincées 2*5 dans de l'eau distillée.

Après rinçage, les membranes sont révélées par chimiluminescence avec le kit pour western blot contre souris et lapin (BM Chemiluminescence Western Blotting Kit, Roche Applied Science).

Les blots ont été répétés deux fois à partir d'extractions de trois feuilles différentes.

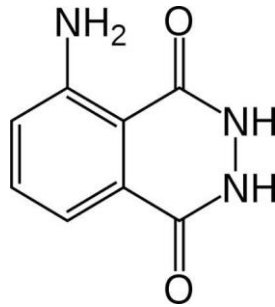
2.7.5 Révélation

Après les dernières étapes de rinçage à l'eau distillée, les membranes sont légèrement égouttées et trempées dans un petit volume de solution de révélation (BM Chemiluminescence Western Blotting Kit, Roche Applied Science), en chambre noire, sous une lumière rouge.

La luminescence correspond au phénomène par lequel certaines molécules portées à un état excité retournent à l'état fondamental en restituant une partie de l'énergie dégagée sous forme d'émission de lumière (les photons $h\nu$).

Selon le mode d'excitation, les types de luminescence sont différents : lumière-photoluminescence, réaction chimique-chimioluminescence, réaction biologique-bioluminescence ...

Le luminol (3-aminophthalhydrazide) est un composé organique qui devient luminescent dans des milieux oxydants. Ainsi, en présence de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et d'un catalyseur (dans notre cas, une peroxydase), un produit activé intermédiaire de la réaction est formé, et son retour à l'état fondamental est associé à la production d'un photon.



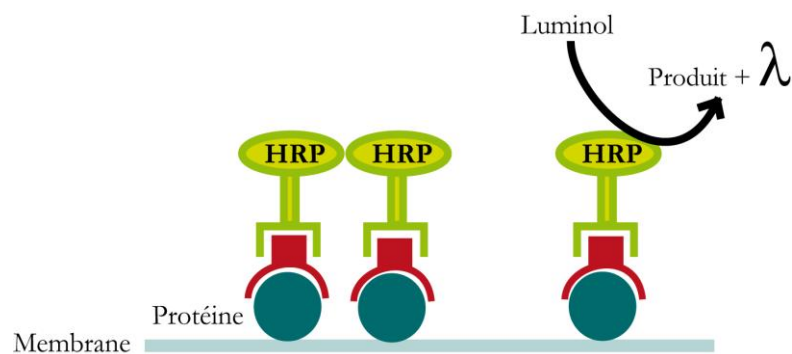
(Fig.17) Luminol

Le luminol présente un pic d'émission à 450nm, dans le bleu.

Ce signal est proportionnel à la quantité de protéines marquées par l'anticorps associé à la HRP.

Les signaux de chimioluminescence sont révélés sur des films photographiques (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare), en chambre noire sous lumière rouge. Les membranes, imprégnées de solution de révélation sont glissées dans une pochette en plastique transparent, puis placées dans une cassette avec le film photographique au dessus, pendant des durées adaptées à l'intensité des signaux (quelques minutes à 1 heure)

Le signal reçu par le film photographique est révélé par un révélateur (ILFORD ID-11 Film Developer) et ensuite fixé par un fixateur (ILFORD IF-2 ACID FIXER).



(Fig.18) Représentation schématique des anticorps primaire (rouge) et secondaire (vert) fixés sur la protéine contre laquelle ils sont adressés. La peroxydase sert de catalyseur pour la réaction du luminol avec H_2O_2 .

Afin de palier à des problèmes d'interprétation liés à la cinétique du signal de chimiluminescence, nous avons fini par utiliser un autre support de révélation. En effet, la révélation sur film photographique suppose d'attendre au moins l'étape de révélation pour adapter le temps de pose adéquat à l'intensité du signal (Annexe 1., étapes 1 à 3).

Il a donc été choisi d'utiliser la forte sensibilité ISO d'un appareil photo numérique associée à de longs temps de pose. La prise de photos en continu permet de suivre la cinétique de l'émission de chimiluminescence et d'adapter rapidement la durée des temps de pose. Le système a été installé en chambre froide (4°C) afin de réduire au maximum le bruit de fond électronique (Annexe 2.)

L'appareil photo est placé au moins 1 heure avant le début des mesures dans la chambre froide (obscur, éclairée si nécessaire par une lumière rouge) afin de le mettre à température.

Les membranes, imprégnées de solution de révélation sont glissées dans une pochette en plastique transparent, et placées dans la zone définie pour la prise de vue.

Par défaut, les réglages de l'appareil photo (Nikon D90, objectif macro Nikon AF-S 24-85) sont les suivants : sensibilité ISO 6400, mode *bulb* (permettant l'action d'un interrupteur pour ouvrir et pour fermer d'objectif, et des temps de pose allant jusqu'à 30 minutes), mode télécommande à Infra Rouge activé.

L'application pour Iphone DSRL.bot permet de contrôler l'appareil photo par un signal Infra Rouge, via des LED Infra Rouge connectées sur une prise Jack

Les images obtenues sont décomposées via les canaux rouge, bleu et vert, par le logiciel libre de traitement d'image ImageJ et seul le signal bleu, correspondant à la chimiluminescence, est conservé.

Pour les deux méthodes de révélation, l'intensité des signaux correspondant aux protéines contre lesquelles les anticorps sont adressés est quantifiée grâce à ImageJ.

2.8 Mesures de la photoinhibition

2.8.1 Réponse à différentes inhibitions de la photosynthèse et de la chaîne de transfert

Afin de localiser plus précisément le transfert alternatif d'électrons vers l'oxygène et d'en estimer l'importance chez les plantes de *Ranunculus glacialis* à l'ombre et à la lumière, plusieurs inhibiteurs et inhibitions sont utilisés :

Le **DBMIB** est un inhibiteur du transport électronique au niveau du site QB du Cytb6/f (Trebst 1974). La feuille est incubée dans 10 mL de DBMIB 30 µM, et le passage de l'épiderme est réalisé en faisant le vide pendant 1 minute. Après les 10 minutes d'incubation à l'obscurité qui suivent le vide, les mesures commencent sur la feuille placée sur du papier filtre humidifié.

Le **glycolaldéhyde** est un inhibiteur de la phosphoribulokinase, et permet d'empêcher le fonctionnement de la Rubisco via l'inhibition de la régénération de RuBP (Wiese, Shi & Heber 1998.). La feuille est incubée dans 10 mL de glycolaldéhyde 100 mM, et le passage de l'épiderme est réalisé en faisant le vide pendant 1 minute. Après les 10 minutes d'incubation à l'obscurité qui suivent le vide, les mesures commencent sur la feuille placée sur du papier filtre humidifié.

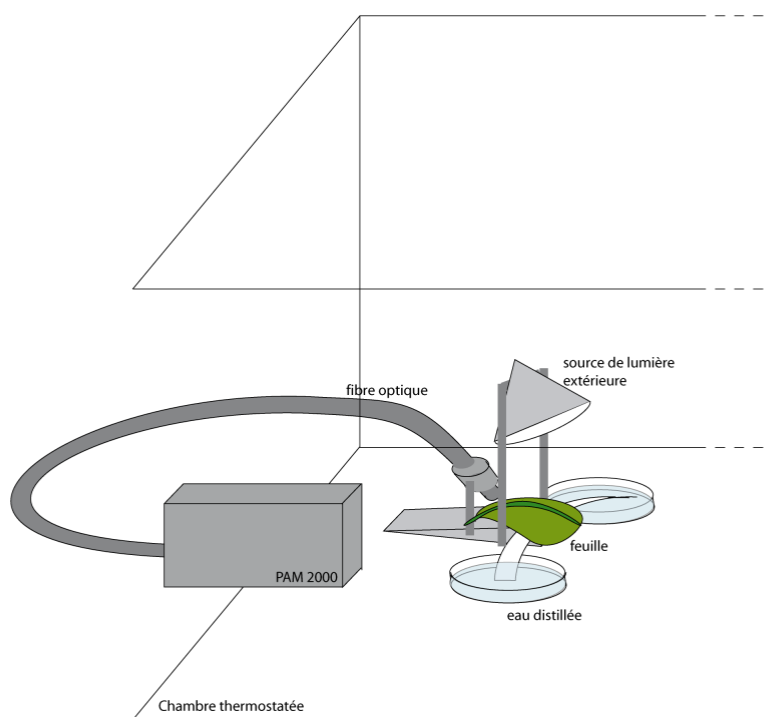
Une autre inhibition consiste à stresser la feuille en la confinant dans une petite enveloppe en plastique soudée, ne permettant pas de réserve suffisante en CO₂ pour la photosynthèse.

Un contrôle est réalisé en incubant la feuille dans de l'eau.

L'état de la feuille est mesuré avant chaque mesure, par évolution de l'oxygène dans des conditions de CO₂ saturant.

Après incubation ou traitement, la feuille coupée est placée dans la pince de mesure d'un PAM 2000, sur le dessus d'un papier filtre maintenu de part et d'autre dans des coupelles d'eau distillée permettant de conserver une atmosphère humide sous la feuille et de garder une bonne ouverture stomatique (dans le cas des traitements DBMIB et glycolaldéhyde et

du contrôle). La température de la feuille est maintenue à 25°C environ tout au long de la mesure.



(Fig.19) Représentation schématique du système de mesure de la fluorescence chlorophyllienne après traitement par un inhibiteur. Il manque le ventilateur à l'intérieur pour assurer un flux d'air.

La feuille est en premier lieu maintenue 30 minutes à l'obscurité, puis est rapidement illuminée avec un flash de lumière rouge sombre, avant la mesure de F_o et F_m .

Après détermination de F_v/F_m la feuille est illuminée par des intensités lumineuses croissantes, chaque intensité étant appliquée durant 30 minutes. Toutes les 5 minutes, un flash saturant permet de mesurer F' et F_m' et à la fin des 30 minutes d'exposition à une intensité donnée, F_o' est déterminé à l'obscurité après une courte période de lumière rouge sombre.

L'efficacité de l'inhibition est mesurée systématiquement par évolution de l'oxygène dans des conditions de CO_2 saturant.

Les mesures ont été répétées au moins 4 fois.

2.8.2 Réponse à la lumière

La lincomycine est un antibiotique qui inhibe la synthèse de protéines en se fixant sur le ribosome (d'origine bactérienne).

Les feuilles, placées dans une boîte de pétri, sont incubées 1 heure à l'obscurité dans 10 mL de lincomycine 3 mM. Après mesure de F_o et F_m , les feuilles sont exposées à une lumière de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Les périodes d'exposition à la lumière durent successivement 1, 3 et 6 heures, et les feuilles sont mises à l'obscurité pendant 30 minutes avant chaque mesure de fluorescence. La photoinhibition est estimée par le ratio F_v/F_m chez les feuilles de *Ranunculus glacialis* acclimatées à l'obscurité, et rapidement exposées à une lumière rouge sombre (5 secondes). Pour ces mesures, les feuilles sont transitoirement placées sur du papier filtre.

Les mesures ont été répétées au moins 4 fois.

2.9 Dosage des pigments

Environ 0,3 g de matériel foliaire est broyé sur la glace dans 5 mL de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 50mM, pH 7,5. 1 mL du broyat obtenu est dilué dans 4 mL d'acétone, puis agité fortement et laissé à reposer à l'obscurité pendant 30 minutes à 1 heure. L'extrait est ensuite centrifugé (10 min, 10 000 g, 4°C).

Le surnageant est mesuré au spectrophotomètre, contre une solution (blanc) à 80% d'acétone.

Les résultats (mg chlorophylle /unité de surface) sont obtenus à partir des formules suivantes: (Porra 2002)

Chlorophylle a (mg/L)= $11,78*(A_{664}-A_{750})-2,29*(A_{646}-A_{750})$

Chlorophylle b (mg/L)= $20,05*(A_{646}-A_{750})-4,77*(A_{664}-A_{750})$

Chlorophylles totales (mg/L)= Chlorophylle a + Chlorophylle b

Caroténoïdes (mg/mL)= $0,0005*(A_{480}+0,114*(A_{664}-0,638-A_{646}))$

Les valeurs des longueurs d'ondes auxquelles se font les mesures ont été déterminées en fonction des spectres d'absorption respectifs de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et des caroténoïdes dans 80 % acétone.

2.10 Activités enzymatiques

Selon les activités enzymatiques ou antioxydants mesurés, les protocoles d'extraction sont variables. Pour le dosage des pigments (chlorophylles, caroténoïdes) et des protéines solubles totales ainsi pour la mesure des activités catalase, glutathion réductase, glycolate oxydase, ascorbate peroxydase, un tampon phosphate est utilisé pour l'extraction.

Environ 0,3 g de matériel foliaire est broyé sur la glace dans 5 mL de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 50 mM, pH 7,5. 4 mL du broyat obtenu sont centrifugés (10 min, 10 000 g, 4°C) et le surnageant constitue l'extrait utilisé pour les mesures.

Les activités enzymatiques sont calculées d'après la formule suivante :

$$[\delta\text{DO}/\text{seconde}) * \text{vol. cuve (mL)} * \text{vol. total broyat (mL)}] / [\varepsilon(\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}) * \text{vol. échantillon (mL)} * \text{trajet optique (cm)}] * [(\text{surf. foliaire (m}^2\text{)}]$$

ε étant le coefficient d'extinction moléculaire

2.10.1 Dosage des protéines totales

1 ml de surnageant est ajouté à 10 ml de TCA 20% v/v. La solution est agitée puis laissée à reposer 12 à 72 heures, en fonction du nombre d'extractions réalisées afin de regrouper les mesures. Pour précipiter les protéines et séparer des acides aminés solubles qui peuvent interférer avec les protéines.

Après repos, la solution est centrifugée (20°C, 5000 g, 15 min), puis le culot est resuspendu sous agitation forte dans 1ml de TCA 5% v/v, puis centrifugé à nouveau (20°C, 5000 g, 15 min).

Après centrifugation, le culot est solubilisé dans 0,5ml de NaOH 0,1 N et 0,5 ml H_2O . Dans un premier temps, on ajoute à la solution 1 ml d'une solution contenant CuSO_4 2% v/v, KNa-Tartrate 2% v/v, et Na_2CO_3 10% v/v, puis 5 minutes plus tard, 3 ml de Folin 10%.

Après 60 minutes d'attente, les échantillons et une gamme de solution BSA sont mesurée spectrometriquement à 540 nm.

2.10.2 Catalase (EC 1.11.1.6)

La catalase est une enzyme localisée dans le peroxysome qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau, grâce à quatre groupes hèmes.

Pour la mesure de son activité, la décomposition du peroxyde d'hydrogène par la catalase est suivie dans l'UV pendant 1 min, à 240nm.

La mesure est réalisée dans une cuve en quartz avec l'ajout de 20 μL d'extrait (surnageant) à 2,98 mL de milieu réactionnel (tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM, pH7 et 80 μL H_2O_2 30%).

Un témoin est réalisé en remplaçant l'extrait par un même volume de tampon phosphate.

L'activité mesurée correspond à l'activité totale de l'enzyme ($\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ dégradées $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$).

$$\varepsilon = 39,4 \text{ moles}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

2.10.3 Glycolate oxydase (EC 1.1.3.15)

La glycolate oxydase est une oxydase du peroxysome faisant partie de la classe des flavoprotéines. C'est une des enzymes clef de la photorespiration, elle est responsable de l'oxydation du glycolate en glyoxylate : elle catalyse la formation de glyoxylate et de H_2O_2 à partir du glycolate et de l' O_2 , en présence de la flavine mononucléotide (FMN).

Le dosage de l'activité glycolate oxydase est basé sur la réaction spontanée entre le glyoxylate et la phénylhydrazine qui produit la glyoxylate-phénylhydrazone, composé qui absorbe dans les UV à 324 nm.

Le milieu réactionnel comprend : eau distillée, tampon Triéthanolamine 0,05 M pH7,8, Triton 0,5% v/v, FMN 12 mM, Phénylhydrazinehydrochloride 0,1 M pH 6,8 et l'extrait.

La réaction est initiée par ajout de glycolate 0,3 M pH 7,0.

Le mélange est incubé 4 min à 25°C avant de suivre la réaction à 324 nm pendant trois minutes au spectrophotomètre.

Deux contrôles sont réalisés en remplaçant le glycolate ou l'extrait par un même volume d'eau distillée.

L'activité mesurée correspond à l'activité totale de l'enzyme ($\mu\text{moles de glyoxylate-phénylhydrazone s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$).

$$\varepsilon = 1,7 * 10^7 \text{ moles}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}.$$

2.10.4 Glutathion réductase (EC 1.6.4.2)

La glutathion réductase catalyse la réduction du GSSG (forme oxydée du glutathion) en GSH (forme réduite). Cette enzyme est localisée dans la chloroplaste, le cytoplasme et la mitochondrie. Pour la réduction de chaque mole de GSSG en GSH, une mole de NADPH est nécessaire. La mesure de son activité est basée sur sa capacité à oxyder le NADPH dans un environnement contenant du GSSG saturant.

Une aliquote d'extrait est ajouté à un milieu réactionnel contenant un tampon K-PO₄ 0,4 M pH8, Na-EDTA 2,4 mM pH8 et GSSG 30 mM. La réaction début avec l'ajout de NADPH 10 mM, et elle est mesurée à 340 nm.

Le contrôle est obtenu en remplaçant GSSG par de l'eau, un second en remplaçant l'extrait par de l'eau.

L'activité mesurée correspond à l'activité totale de l'enzyme ($\mu\text{moles de NADPH dégradées s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$).

$$\varepsilon = 6,2 \times 10^3 \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

2.1.1 Glutathion

Le glutathion est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il intervient dans de nombreuses réactions de detoxification et d'élimination des ROS, grâce à un groupement thiol, permettant notamment de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau.

Le contenu en glutathion est déterminé par activité enzymatique.

Environ 0,3 g de matériel foliaire est broyé dans l'azote liquide dans 5 mL de tampon EDTA (EthyleneDiamineTertaAceticacid) 2mM, HClO₄ 1 M.

L'extrait obtenu est agité, centrifugé (10 min, 10 000 g, 4°C) et le surnageant est utilisé pour la détermination de la concentration en glutathion.

La détermination de la concentration en glutathion est réalisée selon la méthode décrite par Queval et Noctor (2007) : l'extrait est neutralisé par du K₂CO₃ 2,5 M, et le contenu en glutathion est estimé à partir de son oxydation par le DTNB à 0,6 mM (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)), puis par son oxydation par la glutathion réductase 1 U, et NADPH 0,5mM, dans un milieu contenant Na phosphate 100 mM pH7,5, et EDTA 5 mM.

C'est l'oxydation du DTNB qui est mesurée à 412 nm.

Le contenu en glutathion est calibré à partir d'une solution standard.

2.1.2 Ascorbate peroxydase (EC 1.11.1.11)

L'ascorbate peroxydase est une enzyme responsable de la detoxification de peroxydes tels que le peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme utilise l'ascorbate comme substrat, produisant du monodehydroascorbate et de l'eau.

Une aliquote d'extrait est ajoutée à un milieu réactionnel contenant un tampon K-PO₄ 0,1 M, EDTA 5 mM pH7,5, Na-Ascorbate 8 mM et 50µL H₂O₂ 4 mM. La réaction débute avec l'ajout de l'extrait, et elle est mesurée à 290 nm.

Les contrôles sont réalisés en remplaçant l'extrait par le tampon, ou en remplaçant H₂O₂ par le tampon.

L'activité mesurée correspond à l'activité totale de l'enzyme (µmoles d'ascorbate oxydées s⁻¹ cm⁻²).

$$\varepsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

2.1.3 Acide ascorbique

L'ascorbate est présent dans le cytosol, le chloroplaste, la vacuole, la mitochondrie et la paroi cellulaire (Smirnoff 1996). Dans le chloroplaste, la concentration en ascorbate peut être très élevée (jusqu'à 50 mM chez l'épinard. Foyer 1993).

Le contenu en acide ascorbique est déterminé par activité enzymatique.

Environ 0,3 g de matériel foliaire est broyé dans l'azote liquide dans 5 mL de tampon EDTA (EthyleneDiamineTertaAceticacid) 2 mM, acide métaphosphorique 2% w/v.

L'extrait obtenu est agité, centrifugé (10 min, 10 000 g, 4°C) et le surnageant est utilisé pour la détermination de la concentration en ascorbate.

La détermination de la concentration en acide ascorbique réduit est réalisée selon la méthode décrite par Conklin et al. (1996) : l'extrait est neutralisé avec du citrate de sodium 10% w/v, et un aliquote de cette solution est dilué dans du Na phosphate 100 mM, pH5,6.

Avant et après ajout d'ascorbate oxydase $0,04 \text{ U mL}^{-1}$, l'absorbance est mesurée à 265 nm. La différence d'absorbance permet d'estimer le contenu en acide ascorbique réduit.

Le contenu en ascorbate est calibré à partir d'une solution standard.

Chapitre 3

/

Chapter 3

**PTOX promotes oxidative stress when
overexpressed in tobacco**

1. Introduction

Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* var. *petit Havana*) overexpressing the *Arabidopsis thaliana* PTOX gene (*At-PTOX*) were obtained in 2002 (Joët et al. 2002), to answer the question about its supposed activity to oxidize the plastoquinone pool in the chloroplastic electron transfer chain.

In *At-PTOX* overexpressing tobacco, the PTOX protein is functional as demonstrated by an increase of non photochemical reoxidation of the plastoquinone pool in the light, thus reducing chlorophyll fluorescence emission. The manipulation is as follows:

In AT-PTOX overexpressing tobacco non-photochemical reoxidation of the plastoquinone pool by PTOX is indicated by reduced fluorescence quenching after giving two subsequent flashes of saturating light. It is assumed that PTOX oxidises the electrons from the plastochinone pool after the first flash. The area above the fluorescence rise curve during the flash is considered to be proportional to oxidised plastoquinone, which was higher in PTOX+ than in WT plants (Joët et al. 2002).

In isolated chloroplasts, this plastoquinone reoxidation requires molecular oxygen as a substrate (Joët et al. 2002). In contrast, in *Arabidopsis thaliana* PTOX overexpression didn't lead to a better capacity to keep the plastoquinone pool oxidized, and didn't protect from photoinhibition (Rosso et al. 2006).

To further characterize the possible function of PTOX in photoprotection, *At-PTOX* overexpressing tobacco, called PTOX+, was used together with wild type tobacco (Wt), to study its susceptibility to light, using chlorophyll fluorescence measurements of leaves and oxygen evolution of isolated chloroplasts. Besides, ROS generation under these conditions was measured by EPR spectroscopy. Results suggested that PTOX may have a protection role against photoinhibition only if superoxide dismutase (SOD) activity is sufficient to scavenge superoxide produced by PTOX activity. Under these conditions, it was shown that PTOX produces superoxide and not water (Heyno et al. 2009).

2. Plastid alternative oxidase (PTOX) promotes oxidative stress when overexpressed in tobacco

Plastid Alternative Oxidase (PTOX) Promotes Oxidative Stress When Overexpressed in Tobacco

Received for publication, May 15, 2009, and in revised form, September 1, 2009. Published, JBC Papers in Press, September 9, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.021667

Eiri Heyno[‡], Christine M. Gross[‡], Constance Laureau[§], Marcel Culcasi[¶], Sylvia Pietri[¶], and Anja Krieger-Liszka^{‡1}

From the [‡]Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), iBiTecS, CNRS URA 2096, Service de Bioénergétique Biologie Structurale et Mécanisme, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, the [§]Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS-UMR 8079-IFR 87, Université Paris XI, 91405 Orsay Cedex, and the [¶]Sondes Moléculaires en Biologie-Laboratoire Chimie Provence, CNRS UMR 6264, 13397 Marseille Cedex 20, France

Photoinhibition and production of reactive oxygen species were studied in tobacco plants overexpressing the plastid terminal oxidase (PTOX). In high light, these plants were more susceptible to photoinhibition than wild-type plants. Also oxygen-evolving activity of isolated thylakoid membranes from the PTOX-overexpressing plants was more strongly inhibited in high light than in thylakoids from wild-type plants. In contrast in low light, in the PTOX overexpressor, the thylakoids were protected against photoinhibition while in wild type they were significantly damaged. The production of superoxide and hydroxyl radicals was shown by EPR spin-trapping techniques in the different samples. Superoxide and hydroxyl radical production was stimulated in the overexpressor. Two-thirds of the superoxide production was maintained in the presence of DNP-INT, an inhibitor of the cytochrome *b₆f* complex. No increase of the SOD content was observed in the overexpressor compared with the wild type. We propose that superoxide is produced by PTOX in a side reaction and that PTOX can only act as a safety valve under stress conditions when the generated superoxide is detoxified by an efficient antioxidant system.

The plastid terminal oxidase (PTOX² or IMMUTANS) is a plastid-located plastoquinol:oxygen oxidoreductase (1–3). It is distantly related to the alternative oxidase (AOX) of the mitochondrial inner membrane. The active site of both oxidases, PTOX and AOX, comprises a non-heme di-iron center (4, 5). PTOX is a minor component (~1% of PSII levels in *Arabidopsis thaliana*) of the thylakoid membrane and is located in the stroma lamellae (6, 7). PTOX plays an important role in carotenoid biosynthesis and seems to be involved in phytoene desaturation reactions (8–13).

The physiological importance of the role of PTOX as plastoquinol oxidase in alternative photosynthetic electron transport pathways is unclear. Evidence that PTOX acts as a plastoquinol oxidase was shown in tobacco plants, which constitutively expressed the *A. thaliana* PTOX gene (14). It has been suggested that PTOX may serve to keep the photosynthetic elec-

tron transport chain relatively oxidized. Exposure of plants to excess light may result in over-reduction of the plastoquinol pool and may lead to photoinhibition (15). However, no major role for PTOX in oxidizing the PQ pool was found in chlorophyll fluorescence assays when thylakoids from wt *A. thaliana* and the immutans mutant lacking PTOX were compared (16).

Recently, several groups reported that the PTOX level increased under natural stress conditions in several species specialized to harsh environmental conditions. This was the case in *Ranunculus glacialis*, an alpine plant, when it was acclimated to high light and low temperature (17); in the halophyte *Thellungiella halophila* when it was exposed to salt stress (18); and in *Brassica fruticulosa* when it was exposed to elevated temperature and high light (19). Although these findings support the hypothesis that PTOX may serve as a safety valve under stress conditions, they are in direct conflict with the data of Rosso *et al.* (20). These authors have shown that overexpression of PTOX in *A. thaliana* did not result in an increased capacity to keep the plastoquinone pool oxidized and did not provide any significant photoprotection. A more detailed study of photoinhibition and the generation of reactive oxygen species (ROS) under photoinhibitory illumination seems to be required to answer the question if and under which conditions PTOX can contribute to photoprotection. Using wt and PTOX⁺ plants that overexpress PTOX (14), we investigated the susceptibility to light by measuring the loss of variable chlorophyll fluorescence in leaves and oxygen evolution in isolated thylakoids. Furthermore, we followed the light-induced generation of ROS by spin trapping EPR spectroscopy. We suggest, based on Western blots, that PTOX can only act as a safety valve and protect against photoinhibition when the level of SOD is adjusted to the actual level of PTOX.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals—All chemicals were of the highest grade from commercial suppliers. The spin trap α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-tert-butyl nitron (4-POBN) was obtained from Sigma. The nitron 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (DEPMPO) was synthesized according to Ref. 21. Commercial antibodies directed against D1, Cu/Zn-SOD, and Fe-SOD were obtained from Agrisera (Sweden).

Plant Material—Tobacco wild-type plants (*Nicotiana tabacum* var. petit Havana) and the plants overexpressing PTOX (14) were grown for 3 months on soil in a growth cabinet

¹ To whom correspondence should be addressed: CEA Saclay, iBiTec-S, Bât. 532, 91191 Gif-sur-Yvette, France. Fax: 33169088717; E-mail: anja.krieger-liszka@cea.fr.

² The abbreviations used are: PTOX, plastid alternative oxidase; AOX, alternative oxidase; wt, wild type; ROS, reactive oxygen species; DEPMPO, 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide; SOD, superoxide dismutase; DNP-INT, 2'-iodo-6-isopropyl-3-methyl-2',4,4'-trinitrodiphenylether.

(24 °C day/18 °C night) under an irradiance of 150 or 450 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Escherichia coli Expressing PTOX—*E. coli* cells expressing *Arabidopsis* PTOX (22) were grown in M9/glycerol medium until $D_{600} = 0.3$. Isopropyl thio- β -D-galactoside was then added (final concentration 40 μM) to induce the expression of the recombinant gene during 12 h. The control strain was grown in parallel. *E. coli* membranes were prepared according to Ref. 22.

Chloroplast Preparation—Intact chloroplasts were prepared according to Ref. 23. MnCl_2 was omitted from the medium because it interfered with EPR measurements. Intact chloroplasts (20–50 μg of Chl ml^{-1}) were shocked for 20 s in 5 mM MgCl_2 , 25 mM HEPES, pH 7.5. Then an equal volume of 0.6 M sorbitol, 5 mM MgCl_2 , 25 mM HEPES, pH 7.5, was added. The intactness of the chloroplasts was determined as the ratio of light-driven reduction of the membrane impermeable $\text{K}_3\text{-}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ measured with intact and osmotically shocked chloroplasts. The intactness of the chloroplasts was 70–80%.

Photoinhibition Treatment Leaves—The leaves were first kept at low light (8 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 4 h with the petioles in lincomycin solution (1 g/liter). The photoinhibitory illumination was done in a growth cabinet with controlled temperature (22 °C), and the temperature of the illuminated leaves was around 28 °C. The petioles were kept in the lincomycin solution during the whole illumination period. During the illumination, samples were taken from the leaves for measurements of fluorescence.

Thylakoids—Prior to the photoinhibitory treatment, the chloroplasts were shocked. Thylakoids were illuminated with white light (120 or 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), stirred, and kept at 20–22 °C.

Fluorescence Measurements—The initial (F_o) and maximum (F_m) fluorescence levels were measured with a pulse amplitude modulated fluorometer (PAM 101; Heinz Walz, Effeltrich, Germany), using a saturating flash (7000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$; duration, 1 s) for F_m . The variable fluorescence ($F_v = F_m - F_o$) was calculated. The samples were dark adapted for 30 min before each measurement to allow most of the reversible light-induced fluorescence quenching to relax.

Measurements of Electron Transport Activity—Light-saturated electron transport activity was measured as the rate of oxygen evolution in shocked chloroplasts using 1 mM $\text{K}_3\text{-}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (ferricyanide) or 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone (DCBQ) as electron acceptor and 0.5 mM NH_4Cl as uncoupler using an oxygen electrode.

EPR Measurements—Spin-trapping assays with 4-POBN were carried out using freshly shocked chloroplasts at a concentration of 10 μg of Chl ml^{-1} . Samples were illuminated for 5 min with white light (120 or 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in the presence of 50 mM 4-POBN, 4% ethanol, 50 μM Fe-EDTA, and buffer (25 mM Hepes, pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 0.3 M sorbitol).

When *E. coli* membranes were used, sonicated membranes (0.4 mg protein ml^{-1}) were incubated for 5 min in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 with 5 mM succinate as electron donor in the presence of 50 mM 4-POBN, 4% ethanol, 50 μM Fe-EDTA.

Spin-trapping assays with DEPMPO were carried out with thoroughly washed thylakoids (washing buffer contained 25

Overexpression of PTOX Stimulates ROS Production

mM HEPES, pH 7.5, and 5 mM MgCl_2) at a concentration of 50 μg of Chl ml^{-1} . Samples were illuminated for 5 min with white light (1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in the presence of 50 mM DEPMPO, 1 mM DTPA and buffer (25 mM Hepes, pH 7.5, 5 mM MgCl_2).

EPR spectra were recorded at room temperature in a standard quartz flat cell using an ESP-300 X-band (9.73 GHz) spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany). The following parameters were used: microwave frequency 9.73 GHz, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude: 1G, microwave power: 63 milliwatt in DEPMPO assays, or 6.3 milliwatt in 4-POBN assays, receiver gain: 2×10^4 , time constant: 40.96 ms; number of scans: 4.

SDS-PAGE and Western Blotting—SDS-PAGE was carried out in 12% polyacrylamide gel. Western blotting was performed using nitrocellulose membrane and a Multiphor II Novablot unit (Amersham Biosciences). For detection, the enhanced chemoluminescence (ECL) system (Amersham Biosciences) was used according to the manufacturer's protocol.

RESULTS

Influence of High Amounts of PTOX on Photoinhibition—In this study, tobacco plants (PTOX⁺) overexpressing the plastid terminal oxidase from *A. thaliana* (14) were used. PTOX⁺ and wt plants were grown at 450 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. When attached leaves were exposed to photoinhibitory light (1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a similar loss of variable fluorescence was observed for both, wt and PTOX⁺ plants. The recovery of variable fluorescence in low light (8 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was significantly faster in the wild type than in PTOX⁺ plants (Fig. 1A). To investigate whether the PTOX⁺ plants were more susceptible to photoinhibition, leaves of wt and PTOX⁺ were incubated for 4 h in lincomycin to block the synthesis of D1 and thereby the repair of damaged PSII centers. Leaves were illuminated for up to 4 h with 850 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the ratio of F_v/F_m , a measure of the maximum quantum yield of photosynthesis, was determined. Prior to high light exposure, F_v/F_m was 0.81 for wt and PTOX⁺, consistent with measurements on a wide range of unstressed higher plants (24). During high light exposure, the loss of variable fluorescence was considerably higher in PTOX⁺ than in wt (Fig. 1B). When plants grown at 150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were illuminated with 400 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a much lower loss of F_v/F_m was observed and no significant difference between PTOX⁺ and wt was found (data not shown).

In addition to measurements of chlorophyll fluorescence in leaves, photoinhibition was measured as loss of the activity of the electron transfer chain in isolated thylakoids from wt and PTOX⁺ (Fig. 2). Thylakoids from PTOX⁺ illuminated with low light (120 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) showed almost no loss of activity while in wt thylakoids 20% of oxygen evolution was lost after 20 min of illumination. However, when thylakoids were illuminated with high light (1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) just the opposite effect was observed (Fig. 2B). Thylakoids from PTOX⁺ were more susceptible to illumination with high light intensities than those from wt (Fig. 2A). The loss of electron transport activity was about 10% higher than in wt thylakoids. To distinguish between

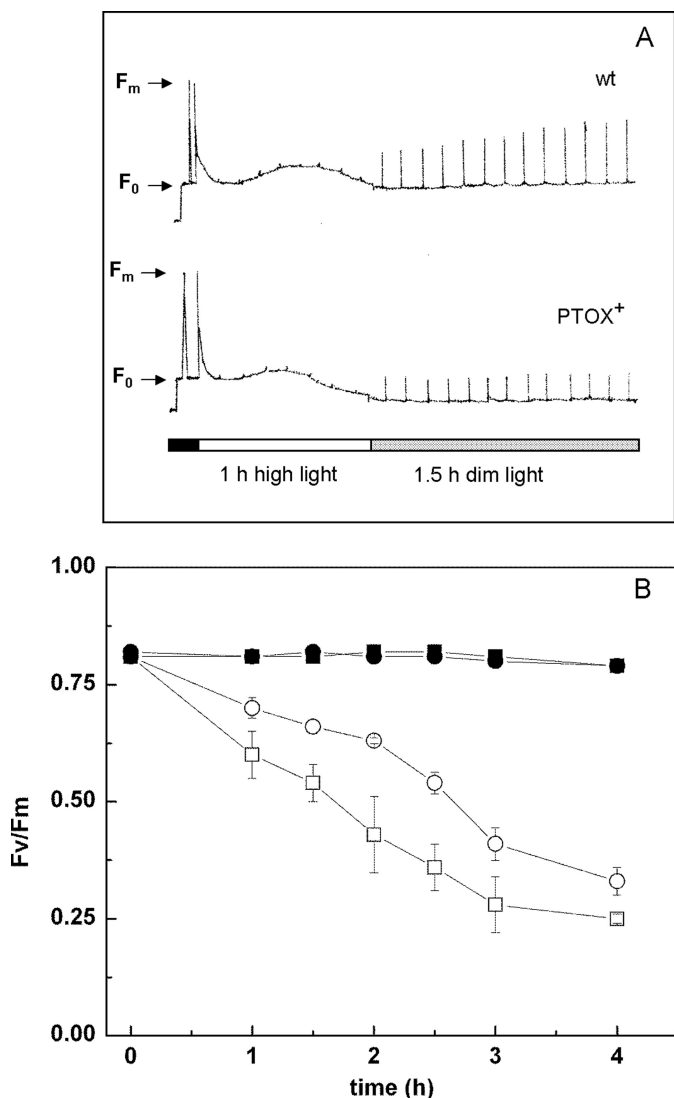


FIGURE 1. Effect of high light on chlorophyll fluorescence in wt and PTOX⁺ leaves. *A*, fluorescence measurements on attached leaves of wild-type and PTOX⁺ plants. Plants were dark-adapted for 30 min prior to the measurements. Segments of the leaves were illuminated for 1 h with white light ($1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and then transferred to dim light ($8 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 1.5 h. *B*, detached leaves were incubated with lincomycin. Circles, wt; squares, PTOX⁺ leaves, filled symbols, incubated at low light ($8 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), open symbols, incubated at high light ($850 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Error bars represent S.D. (nine independent experiments).

damage of the total electron transport chain and damage of PSII, the activity was measured by using ferricyanide as electron acceptor to determine the activity of the total linear electron transport and by using DCBQ as electron acceptor for PSII. The data show that the most susceptible part of the electron transport chain is PSII. Addition of SOD rescued the electron transfer activity of PTOX⁺ thylakoids to a level comparable with the wt (Fig. 2C). The addition of SOD had no effect on the light-induced damage of photosynthetic electron transport in wt thylakoids (Fig. 2C). These photoinhibition experiments were performed in the absence of an uncoupler. No external electron acceptor was present during the photoinhibition treatment leaving oxygen as the only available electron acceptor.

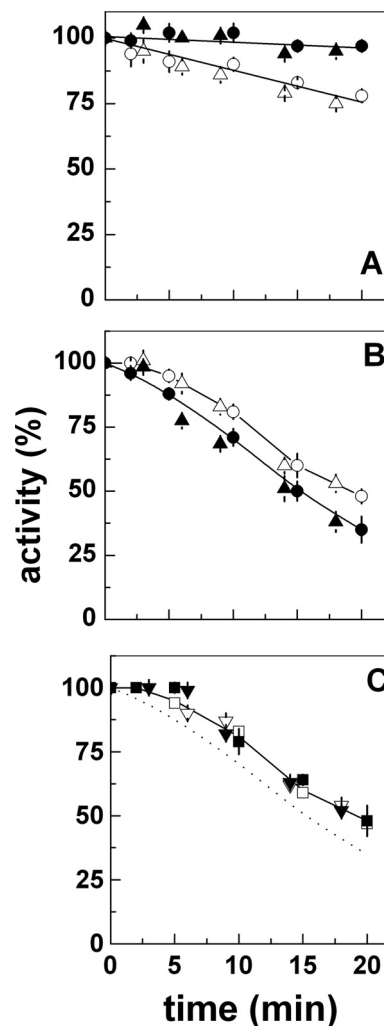


FIGURE 2. Photoinhibition assays on wt and PTOX⁺ thylakoids in low and high light. Freshly shocked thylakoids were incubated: (*A*) at low light ($120 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), wt with ferricyanide (\circ), and DCBQ (Δ), and PTOX⁺ with ferricyanide (\bullet), and DCBQ (\blacktriangle); (*B*), same as *A* but at high light ($1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (*C*), high light ($1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in the presence of SOD, wt with ferricyanide (\square), and DCBQ (∇), and PTOX⁺ with ferricyanide (\blacksquare), and DCBQ (\blacktriangledown). $50 \mu\text{g SOD/ml}$ were added prior to the photoinhibitory illumination. The dotted line is the same as the lower line in panel *B*, and the difference between it and the solid line shows the protective effect of SOD. The maximum activity was between $270\text{--}290 \mu\text{mol of O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for both wt and PTOX⁺ thylakoids in the presence of ferricyanide and $400\text{--}425 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the presence of DCBQ as electron acceptor. Error bars represent S.D. (3–4 independent experiments).

Influence of High Amounts of PTOX on ROS Production—ROS, including superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals (HO^\bullet), can be generated by the reduction of oxygen in photosynthetic electron transfer in a number of different reactions: O_2 can act as terminal acceptor in the so-called Mehler reaction at the acceptor side of PSI, it can be reduced by plastoquinones in the membrane (25), it can be reduced at the acceptor side of PSII (26–30), and it is the electron acceptor of the plastid terminal oxidase, which uses two plastoquinol molecules as electron donor (4, 5, 31). We investigated the light-induced formation of ROS by EPR spectroscopy using either ethanol/4-POBN or DEPMPO as the spin traps. Performing 4-POBN spin trapping in the presence of ethanol is a general procedure to indirectly prove the formation of

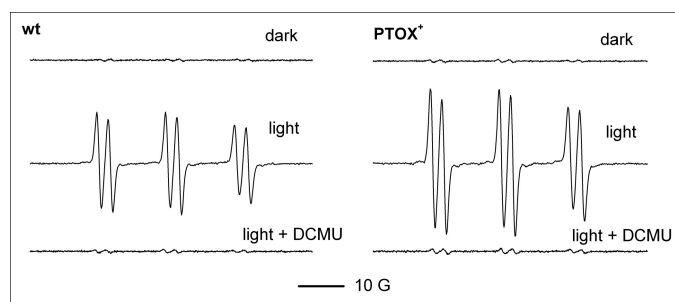


FIGURE 3. Light-induced hydroxyl radical formation in wt and PTOX⁺ thylakoids. Generation of hydroxyl radicals is shown by indirect spin trapping with 4-POBN/ethanol. Typical EPR spectra of the 4-POBN/ α -hydroxyethyl adduct are shown. Samples were illuminated for 5 min at high light (1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Where indicated, 10 μM DCMU was added prior to the illumination.

TABLE 1
ROS production in wt and PTOX⁺ thylakoids

Thylakoids were illuminated for 5 min at high light (1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in the presence of the spin traps 4-POBN (50 mM)/ethanol or DEPMPO (50 mM). Where indicated 10 μM DCMU, 10 μM DNP-INT, or 50 μg of SOD/ml were added prior to the illumination. The double integral of the total signal obtained with wt thylakoids after illumination was set to unity. If not stated otherwise four spectra of different preparations were used to calculate the mean and the standard deviation.

	EPR signal size	
	wt	PTOX ⁺
4-POBN/EtOH		
Light	1.00 \pm 0.10	1.56 \pm 0.15
Light + DCMU	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
Dark	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
DEPMPO		
Light	1.00 \pm 0.15 (<i>n</i> = 4)	1.55 \pm 0.23 (<i>n</i> = 9)
Light + DNP-INT	0.31 \pm 0.10 (<i>n</i> = 9)	0.63 \pm 0.09 (<i>n</i> = 5)
Light + DCMU	Not detectable	Not detectable
Light + SOD	0.07 \pm 0.02 (<i>n</i> = 4)	Not detectable
Dark	Not detectable	Not detectable

HO[•] through the detection of the secondary 4-POBN/ α -hydroxyethyl spin adduct (32). The cyclic nitron DEPMPO was used because it forms characteristic, non-exchangeable adducts with OH[•] and O₂^{-•}, and the EPR signal patterns are easily distinguishable (21).

Whereas little or no signal was observed when samples were maintained in the dark in the presence of ethanol/4-POBN, illumination of thylakoids resulted in strong EPR signals as sextets of lines ($a_N = 15.61$ G; $a_{HB} = 2.55$ G) characteristic of 4-POBN/ α -hydroxyethyl aminoxyl (Fig. 3). Representative spectra are shown in Fig. 3. PTOX⁺ thylakoids produced a signal that was ~50% larger than the signal obtained from wt thylakoids after 5 min of illumination with 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ white light (Table 1). Addition of DCMU, an inhibitor of electron transfer in PSII, almost completely inhibited spin adduct formation. Taken altogether, the data of Fig. 3 show that OH[•] radicals were generated by photosynthetic electron transfer reactions and not by excitation of chlorophylls in disordered reaction centers or antenna systems.

In our system, HO[•] could result from a metal ion-assisted Fenton mechanism involving H₂O₂, the disproportionation product of O₂^{-•}. To investigate whether O₂^{-•} was the primary radical species formed experiments were carried out in the presence of DEPMPO instead of 4-POBN/ethanol (Fig. 4). Again no EPR signal was detected in the dark while a complex signal was observed upon illumination. A satisfactory simulation of the

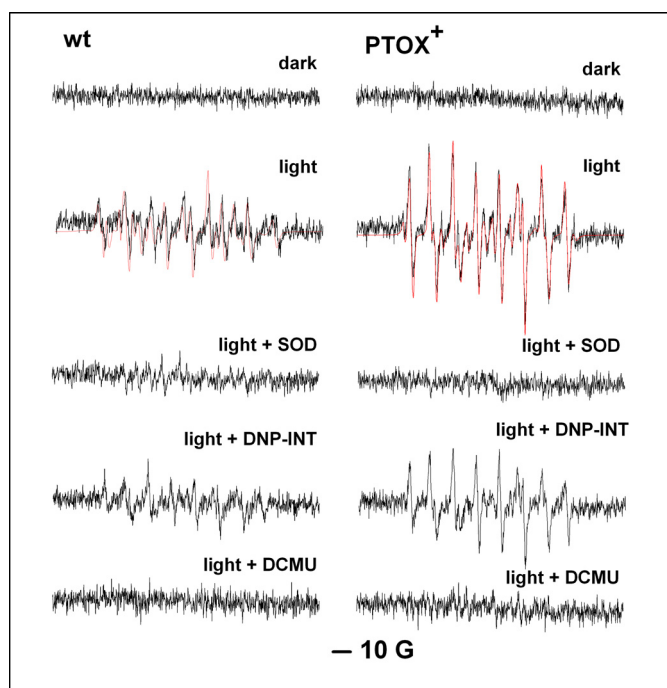


FIGURE 4. Light-induced superoxide formation in wt and PTOX⁺ thylakoids. Typical EPR spectra of the DEPMPO-OOH adduct are shown. Thylakoid samples were illuminated as described in Fig. 4 in the presence of 50 mM DEPMPO. Typical EPR spectra are mixtures of superoxide (~70%), hydroxyl and carbon-centered DEPMPO adducts (red lines, simulated spectra). DEPMPO-OOH is generated as a relatively stable radical after DEPMPO reacts with O₂^{-•}. Samples were illuminated for 5 min at high light (1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Where indicated, 50 μg SOD/ml, 10 μM DNP-INT, or 10 μM DCMU was added prior to the illumination.

signals in Fig. 4 was obtained assuming a mixture of DEPMPO/O₂^{-•} (DEPMPO-OOH; the asymmetrical signal of which could be simulated by the 1:1 mixture of two species having the coupling constants: $a_N = 13.1$ (13.2); $a_P = 50.7$ (49.9) and $a_{HB} = 11.7$ (10.5) G), DEPMPO/HO[•] (DEPMPO-OH: $a_N = 13.0$; $a_P = 47.4$ and $a_{HB} = 15.2$ G) and a carbon-centered/DEPMPO spin adduct (DEPMPO-R; $a_N = 14.4$; $a_P = 45.5$ and $a_{HB} = 21.3$ G). In all spectra, DEPMPO-OOH was the dominant species (~70%) while the remaining DEPMPO-OH and DEPMPO-R appeared in approximately 1:1 mixtures.

PTOX⁺ thylakoids produced an EPR signal which was ~60% larger than the signal obtained from wt thylakoids after 5 min illumination with 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ white light (Fig. 4 and Table 1). In the presence of SOD, the signal in PTOX⁺ thylakoids was completely suppressed while in wt thylakoids a small signal was still observed (Fig. 4). These data indicate that O₂^{-•}, which was primarily generated by illumination, partially decomposed into HO[•], which could in turn undergo hydrogen abstraction from a series of cellular targets to form carbon-centered radicals. The higher level of O₂^{-•} production in the overexpressor suggests that PTOX is responsible for the additional O₂^{-•} generation. However, the Mehler reaction will also contribute to O₂^{-•} generation in thylakoids. To measure electron transport to oxygen in the absence of that reaction, the cytochrome *b_f* inhibitor DNP-INT, a specific inhibitor of the Q_o binding site (33), was added prior to the illumination. In the presence of DNP-INT, the EPR signal size in DEPMPO experiments was reduced by ~30% in PTOX⁺ thylakoids. In wt thy-

Overexpression of PTOX Stimulates ROS Production

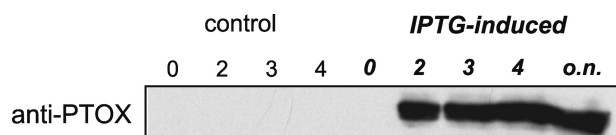


FIGURE 5. Expression of PTOX in *E. coli*. The immunoblot was decorated with polyclonal antibodies directed against PTOX. 250 μ l of culture was taken as a sample at given times after induction by isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (0–4 h and overnight, *o.n.*), centrifuged, and the pellet was resuspended in 50 μ l of SDS loading buffer. 10 μ l were loaded.

TABLE 2

ROS production in control and PTOX-containing *E. coli* membranes

Membranes (0.4 mg protein ml^{-1}) were incubated for 5 min with 5 mM succinate and, when indicated, 0.2 mM decyl-plastoquinone in the presence of the spin trap 4-POBN (50 mM)/ethanol. The double integral of the total signal obtained with control membranes in the presence of decyl-plastoquinone was set to unity. Five spectra were used to calculate the mean and the standard deviation.

	EPR signal size	
	Control membranes	PTOX-containing membranes
No decyl-PQ	Not detectable	0.6 \pm 0.05
+decyl-PQ	1.0 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1

lakoids, the signal size decreased by about 60% in comparison to the signal size measured in the absence of the inhibitor. The data obtained in the presence of DNP-INT show that the Mehler reaction counts for about two-thirds of the O_2^- generation in wt thylakoids. Unfortunately, DEPMPO could only detect O_2^- in thoroughly washed thylakoids while 4-POBN could be used with freshly shocked intact chloroplasts. Although DEPMPO-OOH does not significantly self-decompose into DEPMPO-OH (21), at least two reductive mechanisms occurring in cells can alter the DEPMPO-OOH EPR signal, *i.e.* conversion into DEPMPO-OH by certain enzymes such as glutathione peroxidase (21, 34) or formation of EPR-silent hydroxylamines such as with ascorbate (35, 36). Intense washing did not damage the thylakoids as can be seen by the complete inhibition of the signal in the presence of DCMU.

To test whether the presence of PTOX leads in general to an increase in ROS generation, PTOX was expressed in *E. coli* (Fig. 5), and ROS generation was measured by the spin trap EtOH/POBN in the presence of succinate as electron donor to complex II of the respiratory chain. In the presence of 1 mM KCN a significant level of ROS was formed in control membranes while this ROS generation was reduced by about 50% in PTOX-containing membranes (data not shown). This shows that PTOX functions as an alternative oxidase in this system. PTOX-containing membranes generated a small, but significant, amount of ROS while ROS production in control membranes was hardly detectable (Table 2). Decyl-plastoquinone was added to obtain higher rates of electron flow to PTOX (22). Under these conditions, ROS generation was detectable in control membranes and to a 1.6-fold higher level in PTOX-containing membranes. This result clearly shows that PTOX forms ROS when the quinone pool is over-reduced.

SOD Protein Level in PTOX⁺ and Wt—The question arises why PTOX⁺ thylakoids were more susceptible to photoinhibition in strong light while they were protected in low light compared with wt thylakoids. One possibility is that the antioxidant system in PTOX⁺ cannot cope with the heavier burden of O_2^- generation in high light conditions while it is sufficient to

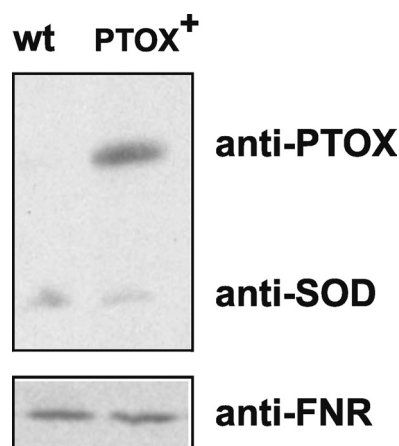


FIGURE 6. PTOX and Cu/Zn-SOD protein levels in wt and PTOX⁺ chloroplasts. The immunoblot was decorated with polyclonal antibodies directed against PTOX and Cu/Zn-SOD. FNR antibodies were used for a loading control. 10 μ g of chlorophyll were loaded.

detoxify the amount of O_2^- under low light illumination. The antioxidant system of the chloroplast consists of SODs and several forms of ascorbate peroxidases. We focused here on SODs, which detoxify O_2^- . The presence of a Cu/Zn-SOD and an Fe-SOD in chloroplasts of *A. thaliana* has been shown (37). In tobacco, one Cu/Zn-SOD is present in the chloroplast and there is evidence for a Fe-SOD on the transcript level (Data Bank Uniprot/Swiss-Prot). To show amounts of SOD, we performed immunoblots of the proteins of intact chloroplasts of wt and PTOX⁺ using polyclonal antibodies directed against PTOX, plastid Cu/Zn-SOD, and Fe-SOD (Fig. 6). Wt and PTOX⁺ chloroplasts contained about the same amount of Cu/Zn-SOD as shown by the reaction with the specific anti-Cu/Zn-SOD antibody. No protein was detected with the anti-Fe-SOD antibody.

DISCUSSION

In the literature it has been shown that PTOX is involved in plastoquinol oxidation (14), and it has been suggested that it plays an important role as a stress-induced safety valve (15, 38) and helps the plants to adapt to stress conditions like salt stress (18), extreme temperatures and high light (17, 19, 39). However, PTOX overexpression did not protect PSII against photoinhibition in either tobacco (14) or *Arabidopsis* plants (20). It is likely that PTOX has a minimal impact on electron transport between PSII and PSI in mature leaves (3, 16, 20) but that it plays an important role in keeping the PQ pool oxidized during chloroplast biogenesis and assembly of the photosynthetic apparatus (20).

In the present study, the susceptibility to light was studied in wt and PTOX⁺ tobacco plants. In high light, PTOX⁺ plants were more damaged than the wt (Figs. 1 and 2) and higher levels of O_2^- (Fig. 4) and other ROS (H_2O_2 and OH^\cdot , Fig. 3) were produced in these plants than in wt. In low light, thylakoids from PTOX⁺ plants were protected against photoinhibition. In low light, in the presence of oxygen as the only available electron acceptor, the reduction state of the PQ pool will be high in wt plants. Under these conditions, the acceptor side of PSII becomes easily reduced and charge recombination reactions

occur between the reduced semiquinones at the acceptor side of PSII and oxidized states of the donor side. Charge recombination reactions in PSII can lead to the formation of triplet chlorophyll in the reaction center which reacts with O_2 to 1O_2 . 1O_2 is likely to be the main responsible species for photoinhibition in low light (40–42). In PTOX⁺ plants, the PQ pool will be less reduced and, therefore, 1O_2 -triggered damage of PSII will be lower. The protein level of SOD will be sufficient to detoxify O_2^- under low light illumination.

In high light, O_2^- produced by the Mehler reaction and other alternative pathways plays an important role in photoinhibition in addition to 1O_2 . The photoinhibition treatment was performed in the absence of an uncoupler so that the presence of a high proton gradient (photosynthetic control) limits oxygen reduction at the level of PSI. We attribute most of the O_2^- production measured in thylakoids to PTOX activity since O_2^- generation was largely increased in PTOX⁺ plants and since it was only partially inhibited by DNP-INT (Fig. 4). Overexpression of PTOX does clearly not protect the photosynthetic electron transport chain from ROS generation but is just doing the opposite. The question arises which process causes the increase in O_2^- production in PTOX⁺ thylakoids and plants. One possibility is that the overexpressed protein is either not correctly assembled or not well integrated into the membrane and produces therefore more O_2^- . This seems to be rather unlikely, because Joët *et al.* (14) have shown that the PQ pool was much faster oxidized in PTOX⁺ plants by measuring chlorophyll fluorescence curves during dark to light transitions.

A second possibility is that the plastoquinol oxidation by PTOX itself produces O_2^- in a side reaction. PTOX is a plastoquinol oxidase that catalyzes the four-electron reduction of oxygen to water. PTOX is distantly related to the AOX of the mitochondrial inner membrane. The active site of both oxidases, PTOX and AOX, comprises a non-heme di-iron center. The molecular mechanism of the reduction of oxygen to water by these oxidases is not known. In analogy to a side reaction of the methane monooxygenase, which contains a non-heme di-iron center and is capable of fully reducing oxygen to water, it was proposed that peroxide intermediates are formed in AOX and PTOX (4, 43). Alternatively it has been proposed that instead of a peroxide intermediate a diferryl center or a divalent ferric-ferryl or diferric iron site together with a protein-derived radical is formed in analogy to the reaction intermediates of the R2 subunit of the class I ribonucleotide reductase (see (43) for a discussion of the different mechanisms). The reaction intermediates of oxidases with non-heme di-iron centers are likely to be sensitive to oxidation. This may lead to the generation of ROS like superoxide. In methane monooxygenase and also in Δ^9 -desaturase, reactivity toward oxygen is controlled to prevent potential side reactions which lead to ROS formation (4). In both enzymes, special mechanisms are employed to ensure the presence of both substrates before the reaction starts. It is an open question if the alternative oxidases, AOX and PTOX, use a similar strategy to ensure that the second quinol is already bound before oxygen binds and thereby allow the timely delivery of the two last electrons needed for the full reduction of oxygen to water. If this is the case, a coupling protein might be needed to avoid O_2^- generation like in the

methane monooxygenase. In such a case, it might be that the expression of such an enzyme is not up-regulated in the PTOX overexpressor.

Alternatively, it could also be envisaged that a tight coupling between the level of SOD and PTOX is needed for an efficient detoxification of the produced O_2^- . As can be seen in Fig. 6, the amount of Cu/Zn-SOD is the same in chloroplasts from PTOX⁺ and wt. Under low light conditions, the amount of SOD seems to be sufficient to detoxify the produced O_2^- while in high light the SOD is limiting and the O_2^- may cause the observed higher damage to PSII in PTOX⁺ thylakoids and leaves (Figs. 1 and 2). In a tobacco mutant lacking complex I of the respiratory chain a higher amount of AOX was found and, at the same time, the level of Mn-SOD (localized in the mitochondria) was increased (44). Plants completely lacking PTOX are more susceptible to photoinhibition (12), while plants which are exposed to an environmental stress that promotes photoinhibition have increased protein levels of PTOX (17–19). Further investigations are needed to show whether there is a correlation between PTOX and SOD levels in alpine plants at high light and cold temperatures (17), in halophytes under salt stress (18) and in oat and *B. fruticulosa* at high light and elevated temperatures (19, 39). Furthermore, a putative functional relationship between PTOX and SOD has to be established in plants which have increased protein levels of both, PTOX and SOD. If this is the case, PTOX could act as a safety valve even under high light conditions in which the PQ pool is highly reduced when the O_2^- level is controlled by SODs.

Acknowledgments—We thank Bernard Genty, CEA Cadarache, for providing us with seeds of PTOX⁺. We would like to thank Sun Un, CEA Saclay, and Peter Streb, Université Paris-Sud, for stimulating discussions. We are grateful to Marcel Kuntz, Université Grenoble, who provided the *E. coli* strain expressing PTOX and antibodies against PTOX and to R. J. Berzborn, Ruhr-Universität Bochum, who provided the antibodies against FNR.

REFERENCES

- Berthold, D. A., and Stenmark, P. (2003) *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 497–517
- Kuntz, M. (2004) *Planta* **218**, 896–899
- Rumeau, D., Peltier, G., and Cournac, L. (2007) *Plant Cell Environ.* **30**, 1041–1051
- Berthold, D. A., Andersson, M. E., and Nordlund, P. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 241–254
- Fu, A., Park, S., and Rodermel, S. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 42489–42496
- Andersson, M. E., and Nordlund, P. (1999) *FEBS Lett.* **449**, 17–22
- Lennon, A. M., Prommeenate, P., and Nixon, P. J. (2003) *Planta* **218**, 254–260
- Wetzel, C. M., Jiang, C. Z., Meehan, L. J., Voytas, D. F., and Rodermel, S. R. (1994) *Plant J.* **6**, 161–175
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G., and Kuntz, M. (1999) *Plant Cell* **11**, 57–68
- Wu, D., Wright, D. A., Wetzel, C., Voytas, D. F., and Rodermel, S. (1999) *Plant Cell* **11**, 43–55
- Carol, P., and Kuntz, M. (2001) *Trends Plant Sci.* **6**, 31–36
- Shahbazi, M., Gilbert, M., Labouré, A. M., and Kuntz, M. (2007) *Plant Physiol.* **145**, 691–702
- Aluru, M. R., and Rodermel, S. R. (2004) *Physiol. Plant.* **120**, 4–11
- Joët, T., Genty, B., Josse, E. M., Kuntz, M., Cournac, L., and Peltier, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 31623–31630

Overexpression of PTOX Stimulates ROS Production

15. Niyogi, K. K. (2000) *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 455–460
16. Nixon, P. J., and Rich, P. R. (2006) *The Structure and Function of Plastids* (Wise, R. R., and Hooper, J. K., eds) pp. 237–251, Springer, The Netherlands
17. Streb, P., Josse, E. M., Gallouët, E., Baptist, F., Kuntz, M., and Cornic, G. (2005) *Plant Cell Environ.* **28**, 1123–1135
18. Stepien, P., and Johnson, G. N. (2009) *Plant Physiol.* **149**, 1154–1165
19. Díaz, M., De Haro, V., Muñoz, R., and Quiles, M. J. (2007) *Plant Cell Environ.* **30**, 1578–1585
20. Rosso, D., Ivanov, A. G., Fu, A., Geisler-Lee, J., Hendrickson, L., Geisler, M., Stewart, G., Krol, M., Hurry, V., Rodermel, S. R., Maxwell, D. P., and Hüner, N. P. (2006) *Plant Physiol.* **142**, 574–585
21. Frejaville, C., Karoui, H., Tuccio, B., Le Moigne, F., Culcasi, M., Pietri, S., Lauricella, R., and Tordo, P. (1995) *J. Med. Chem.* **38**, 258–265
22. Josse, E. M., Alcaraz, J. P., Labouré, A. M., and Kuntz, M. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 3787–3794
23. Laasch, H. (1987) *Planta* **171**, 220–226
24. Bjorkman, O., and Demmig, B. (1987) *Planta* **170**, 489–504
25. Ivanov, B., Mubarakshina, M., and Khorobrykh, S. (2007) *FEBS Lett.* **581**, 1342–1346
26. Ananyev, G., Renger, G., Wacker, U., and Klimov, V. (1994) *Photosynth. Res.* **41**, 327–338
27. Pospisil, P., Arató, A., Krieger-Liszkay, A., and Rutherford, A. W. (2004) *Biochemistry* **43**, 6783–6792
28. Arató, A., Bondarava, N., and Krieger-Liszkay, A. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1608**, 171–180
29. Kruk, J., and Strzalka, K. (1999) *Photosynth. Res.* **62**, 273–279
30. Kruk, J., and Strzalka, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 86–91
31. Cournac, L., Josse, E. M., Joët, T., Rumeau, D., Redding, K., Kuntz, M., and Peltier, G. (2000) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**, 1447–1454
32. Ramos, C. L., Pou, S., Britigan, B. E., Cohen, M. S., and Rosen, G. M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 8307–8312
33. Trebst, A., Wietoska, H., Draber, W., and Knops, H. J. (1978) *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **33**, 919–927
34. Culcasi, M., Rockenbauer, A., Mercier, A., Clément, J. L., and Pietri, S. (2006) *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1524–1538
35. Berliner, J., Khramtsov, V., Fujii, H., and Clanton, T. L. (2001) *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 489–499
36. Karoui, H., Rockenbauer, A., Pietri, S., and Tordo, P. (2002) *Chem. Commun. (Camb)* **24**, 3030–3031
37. Kliebenstein, D. J., and Monde, R. A. (1998) *Plant Physiol.* **118**, 637–650
38. Peltier, G., and Cournac, L. (2002) *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 523–550
39. Quiles, M. J. (2006) *Plant Cell Environ.* **29**, 1463–1470
40. Keren, N., Gong, H., and Ohad, I. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 806–814
41. Keren, N., Berg, A., van Kan, P. J., Levanon, H., and Ohad, I. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1579–1584
42. Krieger-Liszkay, A. (2005) *J. Exp. Bot.* **56**, 337–346
43. Affourtit, C., Albury, M. S., Crichton, P. G., and Moore, A. L. (2002) *FEBS Lett.* **510**, 121–126
44. Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chétrit, P., Foyer, C. H., and de Paepe, R. (2003) *Plant Cell* **15**, 1212–1226

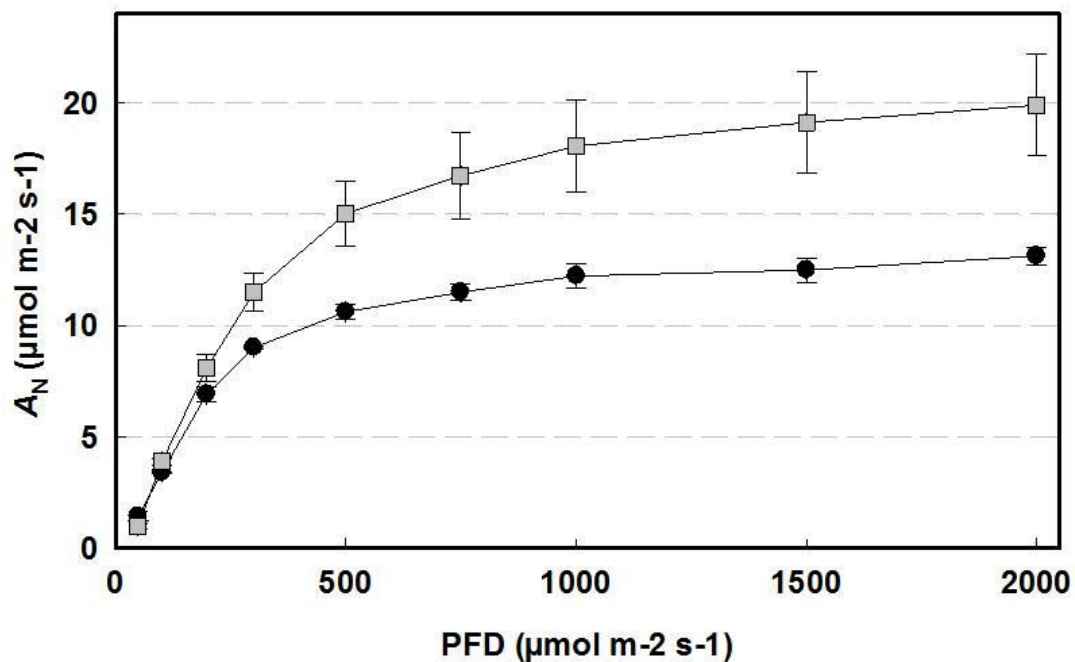
3. Influence of high amounts of PTOX on net CO₂ assimilation and alternative electron flow towards oxygen

PTOX from *Arabidopsis thaliana* (At-PTOX) is functional in tobacco leaves (Joët et al. 2002) but its activity increases the formation of reactive oxygen species (Heyno et al. 2009). Gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements were performed to understand whether At-PTOX overexpression (PTOX+) changes CO₂ assimilation and electron consumption by photosynthetic acceptors. In this study, PTOX+ and Wt plants were grown in a greenhouse at 23°C and approximately 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR supplemented with sunlight in springtime. However, in full sunlight, occasionally photon flux densities at the plant level could exceed 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and temperatures could rise up to 30°C. Wt and PTOX+ plants were used for measurements at the same developmental stage.

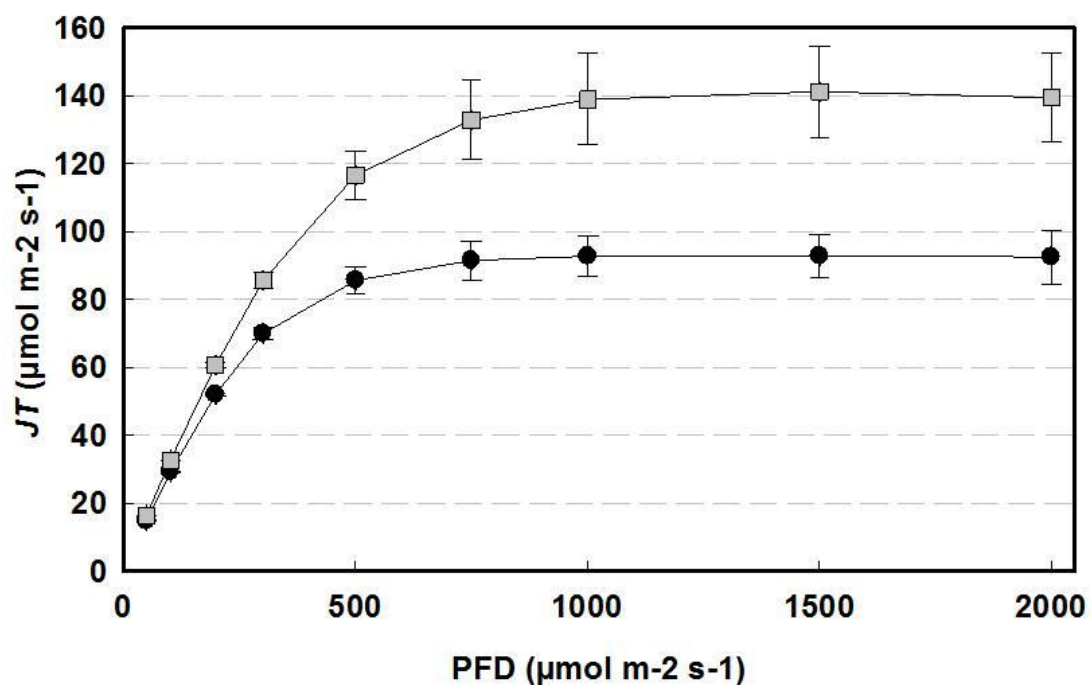
Results:

Carbon assimilation in Wt and PTOX + plants was measured as a function of photon flux density (PFD). Net CO₂ assimilation (A_n) at atmospheric CO₂ partial pressure (380 ppm C_a) saturated at lower PFD in Wt plants than in PTOX+. At high light (2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) A_n was 35% lower in Wt tobacco compared to PTOX+ tobacco (Fig. 1). A similar difference between WT and PTOX + plants was measured in J_T at all PFDs applied. Knowing J_T , A_n and light respiration (R_l), approximated by dark respiration/2, one can estimate the excess electron transport as: $J_T \text{ excess} = J_T - 4(A_n - R_d/2)$. At the highest PFD applied, approximately 55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in PTOX+ and 47 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in WT were transported to alternative acceptors than carbon assimilation. These acceptors include photorespiration and electron flux to PTOX and other acceptors. Since photorespiration should not be changed by PTOX overexpression, one may suggest a slightly increased alternative electron flux to PTOX at high light under atmospheric conditions.

This result was surprising since it was supposed that electron transport to PTOX generate superoxide and affect PSII activity (Heyno et al. 2009) and therefore A_n .



(Fig.1) Light response curve of net CO₂ assimilation (A_n) in wt tobacco (black circles) and PTOX+ tobacco (grey squares) at 23°C, under an atmosphere containing 380 ppm CO₂ and 21% O₂.



(Fig.2) Light response curve of J_T (calculated according to Krall & Edwards) in wt tobacco (black circles) and PTOX+ tobacco (grey squares) at 23°C, under an atmosphere containing 380 ppm CO₂ and 21% O₂.

In order to estimate alternative electron flux in the absence of photorespiration, carbon assimilation in Wt and PTOX+ plants was measured as a function of internal CO₂ molar ratio (C_i) at 21% and at 1% oxygen and under 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A_n of wt tobacco was 22% lower than A_n of PTOX+ tobacco at high C_i (2000 ppm, Ca) Under this condition, A_n was even slightly higher in 21 % oxygen than in 1% oxygen in WT and PTOX+ leaves, confirming the complete inhibition of photorespiration. (data not shown). In 21% and 1 % oxygen, total photosynthetic electron transport (J_T) was markedly lower in Wt plants as compared to PTOX+. At the highest C_i , where photorespiration is suppressed, (J_T 21% - J_T 1%) allows to estimate an alternative electron flow to oxygen, which is higher in PTOX + plants compared to Wt (Table 1) This important difference of alternative electron flow to oxygen between Wt and PTOX+ plants correlates with the difference of PTOX content and suggests that electrons are indeed transported to PTOX.

	C_i (ppm)	A_n 21%O ₂	J_T 21%O ₂	J_T 1%O ₂	J_T 21%O ₂ – J_T 1%O ₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Wt	1370	29	96	74	22
PTOX+	1370	20.7	133	96	37

Table 1. Difference between total electron flux under 21%O₂ and total electron flux under 1%O₂, in an atmosphere containing 2000 ppm CO₂. Values of J_T response to internal CO₂ concentration (C_i) were manually calibrated against all C_i values obtained under 21%O₂.

Discussion

Overexpression of *At-PTOX* in tobacco leads to an increase of reactive oxygen species formation in isolated chloroplasts, under high light (Heyno et al. 2009). In accordance, thylakoids and intact leaves from PTOX+ plants were more markedly photoinhibited than those from Wt plants when illuminated with high light. Furthermore, PTOX+ thylakoids showed higher levels of ROS formation as indicated by higher levels of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. In contrast, thylakoids from PTOX+ plants were less sensitive to photoinhibition under low light, than Wt thylakoids. This result was explained by sufficient SOD activity under low light but not under high light condition (Heyno et al. 2009). From these experiments it was suggested that PTOX overexpression should also affect carbon assimilation in PTOX+ plants, at least at high PFD. Surprisingly, the opposite results were obtained. In WT plants A_n was clearly lower than in PTOX+ plants as a function of PFD and particular at high PFD (Fig. 1). An estimation of J_T at the highest PFD applied and a roughly calculation of excess electron transport, which is not consumed by carbon assimilation, showed higher excess electron transport rates in PTOX+ than in WT plants (Fig. 2). Since photorespiration activity should not be affected by PTOX overexpression, enhanced excess electron transport can be attributed to PTOX. This supposition was confirmed by measuring carbon assimilation as a function of C_i in 21 and 1 % oxygen. The difference of J_T between 21 % oxygen and 1 % oxygen under this condition showed alternative electron flow not related to photorespiration. This electron flow was markedly higher in PTOX+ plants than in the Wt (Table1.) confirming that excess electrons are probably transported to PTOX. Such an enhanced alternative electron flow to PTOX in PTOX+ compared to WT tobacco was previously shown by results of Joet et al (2002) and Heyno et al (2009).

However, at present it is impossible to explain why PTOX+ tobacco in one experimental system produces reactive oxygen species which enhanced photoinhibition, while in another experimental system the same plants showed improved photosynthesis with no indication of reactive-oxygen-species induced damage. Since growing conditions for tobacco plants were not identical under both experimental systems one might speculate that low light growing conditions in Heyno et al. (2009) may have favoured an incomplete yet active assembly of the PTOX protein which may be not the case under growing conditions where occasionally high sunlight exposure requires functional alternative electron acceptors. Alternatively, strongly increased capacities for superoxide

scavenging might be induced in high-light-grown PTOX+ plants. In any case, the enhanced alternative electron transport rates in PTOX+ plants and their higher A_n are in accord with results of *Ranunculus glacialis* (Laureau et al. submitted). Indeed, *Ranunculus glacialis* leaves with higher PTOX content that were induced by high light conditions, showed enhanced electron transport rates attributed to PTOX (Laureau et al. submitted). More importantly, *Ranunculus glacialis* is very sensitive to superoxide formation induced by methylviologen (Streb et al. 1998) and therefore a functional PTOX producing water instead of reactive oxygen species can be postulated. This agrees also with other reports, where the formation of water instead of reactive oxygen species was concluded by a 1:1 ratio of oxygen formation and consumption when PTOX was active (Cournac et al. 2000) and resembles similar problems ask for the PTOX homolog AOX (Moller 2001).

Chapitre 4

/

Chapter 4

The significance of glutathione for photoprotection at contrasting temperature in the alpine plant species *Ranunculus glacialis* and *Soldanella alpina*

1. Introduction

Soldanella alpina and *Ranunculus glacialis* are native to cold environments. *Soldanella alpina* can be grown at sea level and exists till 3000 meters elevation in the Alps, but is often restricted to snow beds, where the vegetation period is shorter due to long lasting snow cover. This species has the particularity to keep leaves green throughout the winter for up to three years (Streb et al. unpublished), and when snow melts at the end of spring, green leaves are still covered by snow at temperatures around the water-freezing point and may be exposed to very high light intensities during the same time (Streb & Cornic 2012). *Ranunculus glacialis* was identified at 4275 meters elevation: it is known to be one of the higher plant species in the Alps which survive at highest altitudes (Zimmermann 1975), and this species is generally not found at altitudes lower than 2400 meters in the Alps. This is probably a consequence of its high sensitivity to elevated temperatures (Streb et al. 2003). However, *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* can experience very high temperature events up to 40°C during the growing season.

Low temperature slows down enzymatic reactions as for example the Calvin cycle, of sugar synthesis and of sugar transport (Falk et al. 1996). Lowering the temperature at identical light could thus increase the reduction state of the electron transport chain, as light absorption and primary electron transport are less affected by low temperature. As a consequence, excess electrons can be transferred to oxygen forming reactive oxygen species, leading to photoinhibition and potentially induce cellular damage (Asada 2006). High temperatures can also induce reactive oxygen species formation by affecting photosynthetic electron transport and Rubisco activation.

Under their natural growing condition, *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* did not show any marked photoinhibition of PSII (Streb et al. 1997), but under heat (38°C) and high light conditions, both showed marked photoinhibition (Streb et al. 2003c). Previous investigations suggested that the role of antioxidative protection is very different in *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* leaves (Streb et al. 1997 and 1998).

To investigate the importance of antioxidative protection for tolerance against photoinhibition at various temperatures and under high light, *Soldanella alpina* and

Ranunculus glacialis leaves were incubated in the presence of buthionine-sulfoximine (BSO) to diminish leaf glutathione contents.

2. The significance of glutathione for photoprotection at contrasting temperatures in the alpine plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*

The significance of glutathione for photoprotection at contrasting temperatures in the alpine plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*

Constance Laureau^a, Richard Bligny^b and Peter Streb^{a,*}

^aUniversité Paris-Sud 11, Ecologie, Systématique et Evolution, UMR-CNRS 8079, Bâtiment 362, 91405 Orsay Cedex, France

^bLaboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Unité Mixte de Recherche 5168, Institut de Recherche en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA, 17 rue des Martyrs, 38 054 Grenoble Cedex 9, France

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: peter.streb@u-psud.fr

Received 18 May 2011;
revised 17 June 2011

doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01505.x

The significance of total glutathione content was investigated in two alpine plant species with highly differing antioxidative scavenging capacity. Leaves of *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* incubated for 48 h in the presence of buthionine–sulfoximine had 50% lower glutathione contents when compared with leaves incubated in water. The low leaf glutathione content was not compensated for by activation of other components involved in antioxidative protection or electron consumption. However, leaves with normal but not with low glutathione content increased their ascorbate content during high light (HL) treatment (*S. alpina*) or catalase activity at low temperature (LT) (*R. glacialis*), suggesting that the mere decline of the leaf glutathione content does not act as a signal to ameliorate antioxidative protection by alternative mechanisms. CO₂-saturated oxygen evolution was not affected in glutathione-depleted leaves at various temperatures, except at 35°C, thereby increasing the high temperature (HT) sensitivity of both alpine species. Leaves with low and normal glutathione content were similarly resistant to photoinhibition and photodamage during HL treatment at ambient temperature in the presence and absence of paraquat or at LT. However, HL- and HT-induced photoinhibition increased in leaves with low compared to leaves with normal glutathione content, mainly because the recovery after heat inactivation was retarded in glutathione-depleted leaves. Differences in the response of photosystem II (PSII) activity and CO₂-saturated photosynthesis suggest that PSII is not the primary target during HL inactivation at HT. The results are discussed with respect to the role of antioxidative protection as a safety valve for temperature extremes to which plants are not acclimated.

Introduction

Many cold-acclimated plant species have higher antioxidative scavenging capacities than non-cold-acclimated plants (Noctor and Foyer 1998, Schöner and Krause 1990, Streb et al. 1999). Low temperature

(LT) slows down enzymatic reactions (e.g. of the Calvin cycle), while light absorption and primary electron transport are much less affected (Falk et al. 1996). As a consequence, the photosynthetic electron transport chain can become reduced, electrons may be transferred to form reactive oxygen and photoinhibition and lipid

Abbreviations – BSO, buthionine–sulfoximine; HL, high light; HPLC, high-pressure liquid chromatography; HT, high temperature; LL, low light; LT, low temperature; MDA, malondialdehyde; PFD, photon flux density; PTOX, plastid terminal oxidase; ROS, reactive oxygen species.

peroxidation could lead to cellular damage (Asada 2006, Foyer and Shigeoka 2011, Noctor and Foyer 1998, Öquist and Huner 2003, Wise 1995). Hence, an increased reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity of cold-acclimated plants appears to be a plausible strategy to alleviate photodamage at LT.

High temperatures (HTs) are known to affect ATP synthesis, photosynthetic electron transport and Rubisco activation (Haldimann and Feller 2004, Hüve et al. 2006, Kim and Portis 2005, Salvucci and Crafts-Brandner 2004, Wise et al. 2004). Under such conditions, excess light absorption also enhances ROS formation. Thus, oxidative stress and higher ROS contents are also involved in heat-induced damage or, alternatively, induce defense mechanisms (Dat et al. 1998, Hüve et al. 2011, Larkindale and Knight 2002, Locato et al. 2008, Sharkey 2005). This suggests that antioxidative scavenging is involved in both cold and heat stress in light.

The two alpine plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* grow in an alpine environment at elevations higher than 2400 m, where LT is prevailing and occasionally combined with exceptional high light (HL) intensities (Streb and Cornic, in press). On the other hand, in summer leaf temperatures may increase to values above 30°C. Very high leaf temperatures of 40°C and higher were reported by Körner (1999) and Larcher et al. (2010) in alpine, sun-exposed leaves.

Under natural growing conditions, the two alpine species do not show any marked photoinhibition of photosystem II (PSII), catalase or photodamage to chlorophyll, suggesting that these plants are well protected from light damage in situ (Streb et al. 1997). In addition, when leaves of both species were irradiated with high photon flux density (PFD) on ice, symptoms of photoinhibition and photodamage were absent (Streb et al. 1997, 1998). In contrast, the exposure of leaves to 38°C and high PFD leads to a marked photoinhibition in leaves of *S. alpina* and *R. glacialis* (Streb et al. 2003b). The recovery from this heat-induced photoinhibition of PSII was, however, higher in leaves of *S. alpina* and protein synthesis dependent, whereas the recovery was low in leaves of *R. glacialis* and independent of protein synthesis, as indicated by recovery measurements in the presence and absence of lincomycin (Streb et al. 2003b).

Both alpine plant species apply different strategies with contrasting antioxidative scavenging capacities, possibly protecting the leaves from photoinhibition and photodamage (Streb et al. 1998, 2005). Leaves of *S. alpina* have very high antioxidative protection capacities as indicated by very high contents of ascorbic

acid (Streb et al. 2003a) and high activities of antioxidant enzymes such as catalase, glutathione reductase and superoxide dismutase (Streb et al. 1997). Furthermore, the contents of carotenoids, and especially those of the xanthophyll cycle, are very high in *S. alpina* leaves and de-epoxidation of violaxanthin to zeaxanthin protects *S. alpina* leaves from photoinhibition as suggested by a high sensitivity to dithiothreitol (DTT) (Streb et al. 1998), a known inhibitor of violaxanthin de-epoxidase (Demmig-Adams et al. 1990). In accordance, *S. alpina* leaves tolerate high concentrations of paraquat, which induce oxidative stress by the formation of superoxide (Streb et al. 1998). On the contrary, leaves of *R. glacialis* have low activities of most antioxidative enzymes, a low ascorbate and carotenoid content, and de-epoxidation of violaxanthin and non-photochemical fluorescence quenching are much lower than in *S. alpina* under varying experimental conditions (Streb et al. 1998, Wildi and Lütz 1996). *Ranunculus glacialis* may protect its leaves from photoinhibition by a high photosynthetic capacity, photorespiration and possibly by plastid terminal oxidase (PTOX) activity (Streb et al. 2005). The very high PTOX content of *R. glacialis* leaves compared to other alpine species suggests a specific function of PTOX as electron acceptor in the photosynthetic electron transport chain, thereby avoiding the formation of ROS (Streb et al. 2005).

To investigate the importance of antioxidative protection in these two contrasting plant species at various temperatures and HL, the content of glutathione was decreased by incubating leaves with buthionine-sulfoximine (BSO). BSO blocks the activity of γ -glutamylcystein synthase (Meister 1983). Incubation of rye leaves in the presence of BSO declined the glutathione content of leaves markedly, however, with different efficiency in cold- and non-cold-acclimated leaves (Schäfer and Feierabend 2000, Streb and Feierabend 1999, Streb et al. 1999). Glutathione participates in the plant defense against oxidative, chilling and freezing stress and in maintaining cellular redox homeostasis as well as in signaling and enzyme regulation (Foyer and Noctor 2011, Foyer and Shigeoka 2011, Gomez et al. 2004, Kocsy et al. 2000a, 2000b, 2001, May et al. 1998, Meyer 2008, Rouhier et al. 2008). Glutathione is the substrate of dehydroascorbate reductase for regenerating reduced ascorbate. Reduced ascorbate is the substrate of ascorbate peroxidase for detoxification of H₂O₂, for the regeneration of α -tocopherol, which arrests lipid peroxidation chain reactions, and for the de-epoxidation of zeaxanthin (Foyer and Noctor 2011, Foyer and Shigeoka 2011, Noctor and Foyer 1998).

If glutathione is essential in protection from temperature stress in light in either plant species, this system

should be weakened by low glutathione content and sensitivity to photodamage should increase. In case antioxidant protection is more important in *S. alpina* leaves, this plant species should be more affected by low glutathione content than *R. glacialis* leaves. This study was performed with leaves from plants collected at similar growth sites in the French Alps and aims to clarify the role of glutathione in photoprotection of these leaves, but does not respond to questions related to their different growth conditions and the life cycle.

To evaluate the occurrence of extreme light and temperature conditions at the natural growing site of both plants, measurements of leaf temperature and PFD at the leaf level accompanied the investigations.

Materials and methods

Temperature and light measurements

The temperature of leaves from five independent plants, the air temperature in the shade, the maximum PFD indicated by a horizontal-orientated PFD sensor and the PFD arriving at the leaf level were measured at the site where *S. alpina* and *R. glacialis* plants were collected. Both plants grow at an altitude of 2400 m near the Galibier pass route at two separate sites. This site is the lowest elevation where *R. glacialis* plants grow naturally at the Galibier pass route. For both species, a copper-constantan thermocouple was fixed in order to touch the lower leaf surface. A PFD sensor was placed beside the leaf in parallel to the orientation of the leaf. The temperature and PFD were measured every 30 s and data were stored in a Campbell datalogger (CR23X). Every hour, mean, maximum and minimum temperature and PFD were calculated. An extreme temperature/light event is defined as at least 1 event during 1 h, corresponding to a leaf temperature higher than 30°C or lower than 10°C at PFDs higher than 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Data were accumulated during the main vegetation period from June 16, 2007 till August 2, 2007 for *S. alpina* and from June 23, 2008 till August 6, 2008 for *R. glacialis*.

Inhibition of glutathione synthesis

Mature intact leaves of *S. alpina* and *R. glacialis* plants were collected in the French Alps from the same site as climatic determinations were done. The leaves were washed and incubated for 48 h at reduced daylight (average 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD) and at ambient temperature (approximately 22°C) in petri dishes in the presence and absence of 10 mM BSO at pH 6.0–7.0 (2.5 ml solution per leaf).

Experimental procedure

The leaves were rinsed with deionized water and either directly used for the measurements or further incubated for up to 6 h at a high PFD of 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and at different temperatures (HL treatment) and further allowed to recover at low PFD (10–50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and 22°C (LL recovery). Leaves were incubated in petri dishes which were placed in a water bath for temperature control. The water bath was either filled with ice to obtain leaf temperatures of about 8–10°C (LT), adjusted for a leaf temperature of 22°C or heated to a leaf temperature of 38°C (HT). For some experiments, 10 μM paraquat was added to the petri dishes with a ratio of 2.5 ml solution for one leaf at 22°C incubation temperature.

Analytical measurements

For all analytical measurements, approximately 0.2–0.3 g of leaf material was used.

Oxygen evolution

Oxygen evolution was measured with intact leaves in a Hansatech electrode and an LD2 chamber. Maximum white light was 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD at the leaf level. The temperature of the LD2 chamber was controlled by an external water bath, cooled additionally by an external radiator. The settings of the water bath were adjusted to the desired leaf temperature. For calibration of the leaf temperature, a thermocouple was introduced into the LD2 chamber, instead of the electrode, and measurements with leaves were performed to calibrate the desired leaf temperature to the external water bath settings. Afterwards, the thermocouple was replaced by the electrode and measurements were performed in saturating CO₂ (Streb et al. 1997). The 21% oxygen air signal was calibrated for every leaf temperature by introducing 1 ml of air into the chamber. The measurements started at the lowest measuring temperature in darkness. First, leaf respiration was determined in dark and afterwards maximum photosynthesis was measured at 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD. The temperature was changed in darkness.

Enzyme activities

All enzymes were extracted from washed leaves in 50 mM potassium-phosphate, pH 7.5. After centrifugation, the supernatant was used for measurements of enzyme activities and protein contents. Measurements of activities of catalase (EC 1.11.1.6), glycolate oxidase (EC 1.1.3.1), ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11), guaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7) and glutathione reductase (EC

1.6.4.2) were as previously described (Streb et al. 1997). For ascorbate peroxidase activity, only the cytoplasmic form which does not depend on ascorbate presence during extraction was determined (Amako et al. 1994). The total protein content was estimated by the method of Lowry after precipitation with trichloroacetic acid as described by Gerhardt and Beevers (1968).

Pigment content

The chlorophyll content was measured from 80% acetone extracts with extinction coefficients reported in Porra (2002).

Ascorbic acid and glutathione contents

Ascorbic acid and glutathione contents were either measured from fresh leaves in 1% metaphosphoric acid extracts by high-pressure liquid chromatography (HPLC) as described previously (Streb et al. 1997) or, independently, by enzymatic determination. For enzymatic determination, leaves were extracted in liquid nitrogen and dissolved in 2% metaphosphoric acid + 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (ascorbic acid) or 1 M HClO₄ (glutathione). The extract was thawed, centrifuged and the supernatant was used for determination. The determination of reduced ascorbic acid content followed the procedure described by Conklin et al. (1996). The extract was neutralized with 10% sodium citrate and an aliquot was diluted in 100 mM Na phosphate (pH 5.6). The absorption was measured at 265 nm before and after addition of 0.04 U ml⁻¹ ascorbate oxidase. The difference in absorption was taken as reduced ascorbic acid content.

The measurement of total glutathione content followed the protocol described by Queval and Noctor (2007). Extracts were neutralized with 2.5 M K₂CO₃. The glutathione content was measured in 100 mM Na phosphate (pH 7.5) + 5 mM EDTA by oxidation of glutathione with 0.6 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and recycling oxidized glutathione with 0.5 mM nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH) and 1 U glutathione reductase. The DTNB oxidation was measured at 412 nm.

Ascorbic acid and glutathione contents were calibrated by standard solutions prepared in the same way as the extracts. As results of HPLC measurements and results obtained by enzymatic determination were identical, results were pooled for the figures.

MDA content and membrane leakiness

The content of malondialdehyde (MDA) was measured by the thiobarbituric acid (TBA) method as described

by Hodges et al. (1999). Leaves (1 g 25 ml⁻¹) were extracted with 80% ethanol, centrifuged and the supernatant mixed with (1) 20% trichloroacetic acid + 0.01% butylated hydroxytoluene or (2) with 20% trichloroacetic acid + 0.01% butylated hydroxytoluene + 0.65% thiobarbituric acid. The solution was heated to 95°C for 25 min, centrifuged and the cooled extract was measured at 440, 532 and 600 nm. The MDA content was calculated as described in Hodges et al. (1999).

Membrane leakiness of leaves was determined as described by Baptist et al. (2010). Leaves were washed with deionized water, placed in a tube with 10 ml deionized water and shaken for 24 h at room temperature. After removing the leaf, the conductivity was measured with a conductimeter. Afterwards, the leaf was placed in the same tube, heated to 100°C for 10 min and after cooling the measurement was repeated in the same volume. The membrane leakiness was expressed as % leakage (measurement before boiling/measurement after boiling × 100).

Immunodetection

Immunodetection was performed essentially as described in Streb et al. (2005). Plant material was grinded in liquid nitrogen to a fine powder, suspended in 1 ml of 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 10% sucrose, 0.2% β-mercaptoethanol and 500 μM Pefablock, agitated at 4°C for 30 min and centrifuged at 45 000 g for 20 min at 4°C. The pellet was resuspended in 200–400 μl extraction buffer with the addition of 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 1% Triton-X-100. Agitation and centrifugation were repeated at 20°C. The supernatant containing membrane proteins and soluble proteins was used.

For immunoblotting, 40–60 mg proteins were fractionated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane by electroblotting in Western transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% v/v methanol).

Blotted nitrocellulose membranes were blocked with 5% w/v non-fat milk powder and incubated with primary antibodies against the PTOX protein of *Arabidopsis thaliana*. PTOX antibodies were produced as described previously (Cournac et al. 2000) and used at a final dilution of 1/3000.

Immunodetection was performed using the ECL Western blotting kit (Amersham Bioscience Europe GmbH, Succursale, France) as recommended by the suppliers.

Blots were repeated twice from extractions of three different leaves.

Freezing temperature

The freezing temperature was measured as described in Baptist et al. (2010). Leaves were placed inside a leaf chamber equipped with two thermocouples (for measurements of air and leaf temperature) and additionally connected to a Mini-Pam (Walz, Germany) to record minimal fluorescence. The chamber was cooled by a water bath at a rate of 2°C per h. The freezing temperature of leaves was determined by the increase in leaf temperature at the freezing point of the leaf and in addition by the increase in minimal chlorophyll fluorescence. Leaf destruction by freezing was verified by measuring membrane leakage.

All experiments were repeated independently for at least three times with different plants. Statistical analysis was performed with the SIGMA PLOT program using the Student's *t*-test. Standard errors are indicated in the figures.

Results

Climatic conditions at the growing site

To evaluate climatic conditions and to identify potential extreme climatic events at the leaf level in *S. alpina* and *R. glacialis* plants at their natural growing site, air and leaf temperature as well as maximum PFD and PFD at the leaf level were recorded continuously during the main vegetation period. Mean air temperature during the day and during the night was markedly higher in the year 2008 at the growing site of *R. glacialis* than in the year 2007 at the growing site of *S. alpina*. Mean PFD during the day was comparable at both sites and around 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ during the daytime (8–18 h) (Fig. 1). The lowest leaf temperature measured during

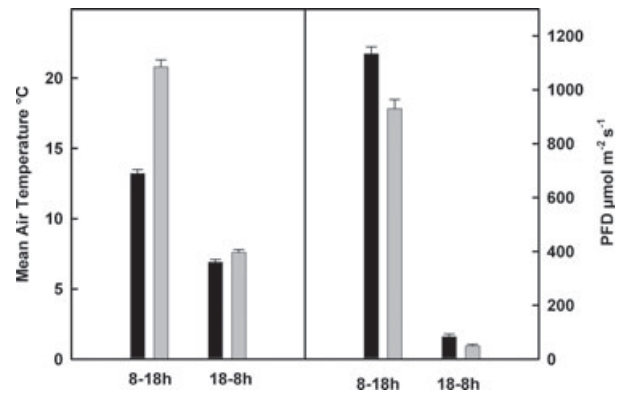


Fig. 1. Mean air temperature in the shade and mean PFD during the day (8–18 h) and the night (18–8 h) at the sites where *Soldanella alpina* (black) and *Ranunculus glacialis* (grey) leaves were collected. Data collection was performed from June 16, 2007 to August 2, 2007 for *S. alpina* and from June 23, 2008 to August 6, 2008 for *R. glacialis*.

the night was -3.7°C for *S. alpina* leaves and -1.9°C for *R. glacialis* leaves, respectively (Table 1). In total, all investigated *R. glacialis* plants experienced a mean leaf temperature lower than 10°C and a corresponding mean PFD of more than $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 12 h within the vegetation period. Similar conditions were measured in all *S. alpina* leaves during 9 h within the vegetation period. However, LT and high PFD extremes were more pronounced in *S. alpina* than in *R. glacialis* leaves, mainly because of the fact that initial measurements included *S. alpina* leaves still covered by snow (Table 1). The other extreme, high mean leaf temperature of more than 30°C at more than $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD was neither measured in *S. alpina* nor in *R. glacialis* leaves. Single HT events (higher than 30°C) occurred, however, in leaves of both plants. The highest leaf temperature peak was measured in *S. alpina*

Table 1. Single climatic temperature and light events in *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* leaves measured at their natural growing site at 2400 m elevation near the Galibier pass route in the French Alps. Data collection was performed from June 16, 2007 to August 2, 2007 for *S. alpina* and from June 23, 2008 to August 6, 2008 for *R. glacialis*. In both species, the leaf temperature and the PFD at the leaf level of five independent plants were recorded every 30 s during the main vegetation period. The number of temperature/light events is defined as at least one measurement during 1-h recording.

	<i>S. alpina</i>	<i>R. glacialis</i>
Lowest leaf temperature (night: 22–4 h)	-3.7°C	-1.9°C
Hours with a mean leaf temperature lower than 10°C at a PFD of more than $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	9 h	12 h
Most extreme combination of low temperature and high PFD	$1.9^{\circ}\text{C} - 1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$6.3^{\circ}\text{C} - 1642 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Highest leaf temperature (night: 22–4 h)	15.9°C	22.1°C
Hours with a mean leaf temperature higher than 30°C at a PFD of more than $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0 h	0 h
Number of high temperature (more than 30°C) events/h at high PFD (more than $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	24	7
Highest leaf temperature at high PFD	$40.5^{\circ}\text{C} - 2634 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$35.5^{\circ}\text{C} - 2128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

leaves with 40.5°C at 2634 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD and in *R. glacialis* leaves with 35.5°C at 2138 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD. In total, at least 24 HT events/hour of more than 30°C at more than 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD were measured in *S. alpina* leaves, while similar conditions occurred only seven times in *R. glacialis* leaves. All HT/HL events in *R. glacialis* leaves resulted from a single plant, while all other plants investigated could keep the leaf temperature lower than 30°C during the whole vegetation period. The results show that *S. alpina* is more frequently and more severely exposed to HT and high PFD than *R. glacialis*, despite lower mean air temperatures during the measuring period. In summary, while low leaf temperature and high PFD conditions are frequent and persisting at the growing site of both plant species, HT and high PFD events are singular events occurring only rarely during the vegetation period.

Glutathione depletion

Pre-treatment at low light (LL) and ambient temperature in the presence of 10 mM BSO for 48 h decreased the glutathione content to about 50% in leaves of

S. alpina and *R. glacialis* compared with control leaves in the absence of BSO (Table 2). No significant effect of BSO pre-incubation was measured on ascorbic acid content, total soluble protein content, several enzyme activities participating in antioxidant protection, chlorophyll content and the freezing temperature of the leaves (Table 2). Leaves with low glutathione content did not show any increase in the MDA content or in membrane leakage when compared with control leaves (Table 2 and Appendix S1). Furthermore, the depletion of glutathione content did not affect the amount of PTOX protein in either plant species. Interestingly, the PTOX protein content was similarly high in leaves of *S. alpina* and *R. glacialis* for which very high PTOX protein contents were previously described (Fig. 2; Streb et al. 2005).

The CO₂-saturated oxygen evolution was not different in *S. alpina* and *R. glacialis* leaves with low or high glutathione content at temperatures between 5 and 25°C. Only at 35°C but not at higher temperature, the oxygen evolution was lower in BSO-treated leaves of both species. Although not significant in *S. alpina* leaves, a lower photosynthetic oxygen evolution at 35°C

Table 2. Effects of pre-incubation for 2 days under non-stressed conditions with 10 mM BSO on several parameters in *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* leaves compared with control leaves incubated in water. Statistical significant difference lower than 1% (***). No other statistical significant difference up to the 10% level was measured. nd, not determined.

	<i>S. alpina</i>		<i>R. glacialis</i>	
	Control	10 mM BSO	Control	10 mM BSO
Total glutathione (nmol g ⁻¹ FW)	431.6 ± 49.9	190.8 ± 31.5***	427.0 ± 55.1	231.9 ± 31.6***
Reduced ascorbate ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$)	30.6 ± 2.3	32.3 ± 2.8	4.7 ± 1.1	4.6 ± 0.9
Malondialdehyde (nmol g ⁻¹ FW)	78.4 ± 8.1	64.6 ± 6.8	26.8 ± 1.8	24.2 ± 1.4
Fv/Fm	0.81 ± 0	0.81 ± 0	0.82 ± 0	0.82 ± 0
Catalase ($\mu\text{kat g}^{-1}\text{FW}$)	86.2 ± 5.7	76.6 ± 4.4	41.3 ± 3.7	43.7 ± 3.9
Glycolate oxidase (nkat g ⁻¹ FW)	17.5 ± 3.9	12.2 ± 2.4	17.3 ± 4.7	19.4 ± 2.7
Ascorbate peroxidase (nkat g ⁻¹ FW)	369.6 ± 48.7	388.9 ± 36.0	242.8 ± 6.0	250.7 ± 18.1
Glutathione reductase (nkat g ⁻¹ FW)	38.7 ± 7.7	39.1 ± 4.7	21.2 ± 1.7	21.9 ± 2.4
Guaiacol peroxidase (nkat g ⁻¹ FW)	nd	nd	10.8 ± 0.9	8.8 ± 1.2
Chlorophyll (mg g ⁻¹ FW)	1.05 ± 0.05	1.05 ± 0.05	0.78 ± 0.03	0.79 ± 0.03
Chlorophyll a/b	3.33 ± 0.08	3.40 ± 0.09	3.46 ± 0.1	3.32 ± 0.1
Protein (mg g ⁻¹ FW)	10.2 ± 2.1	9.8 ± 1.7	7.4 ± 1.9	7.4 ± 1.2
Freezing temperature (°C)	-5.9 ± 0.2	-5.1 ± 0.8	-5.9 ± 1.8	-4.2 ± 0.8

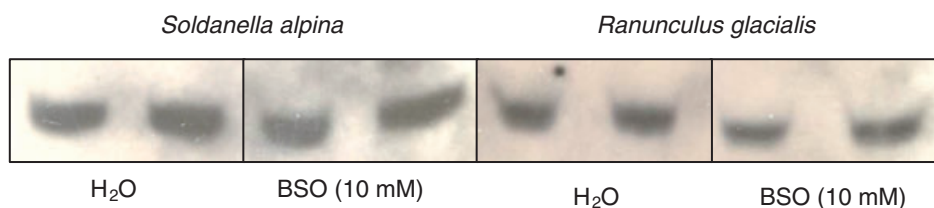


Fig. 2. Immunodetection of PTOX after SDS-PAGE separation of 40 μg of lipid soluble proteins from leaves of *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. Leaves were pre-treated for 48 h at ambient temperature and reduced PFD in the absence (H₂O) or presence of 10 mM BSO. Two representative results are shown for each condition. The antibody was used at a final dilution of 1/3000.

was consistently observed whether photosynthesis was calculated on the basis of leaf area (not shown) or chlorophyll content (Fig. 3). Leaf respiration was not different in BSO-treated when compared with control leaves but increased with the measuring temperature (not shown).

Sensitivity to photoinhibition

Leaves with high or low glutathione content were tested for their susceptibility to photoinhibition of PSII. Intact leaves were incubated in petri dishes floating on water at different temperatures and illuminated with white light of $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HL) corresponding to the mean daytime PFD at the growth site of both plant species (Fig. 1). Fv/Fm ratios declined only slightly in *S. alpina* leaves at LT, while the Fv/Fm decline was more pronounced at HT in particular in *R. glacialis* leaves, in accordance with previous results (Fig. 4; Streb et al. 1997, 2003b). At LT or ambient temperature, low glutathione contents did neither increase photoinhibition in *S. alpina* nor in *R. glacialis* leaves. In addition, also in the presence of low paraquat concentrations at 22°C , the changes in the Fv/Fm ratios, the chlorophyll contents, the catalase activities and the membrane leakages were not markedly affected in glutathione-depleted leaves relative to untreated leaves. Remarkably, in the presence of paraquat catalase activity remained higher in glutathione-depleted *S. alpina* leaves than in leaves with normal glutathione content (Appendix S2).

At 38°C , the decline of Fv/Fm ratios was clearly light dependent and significantly enhanced in glutathione-depleted leaves of both species after 6-h incubation. In addition, Fv/Fm ratios declined also in darkness in glutathione-depleted *R. glacialis* leaves (Fig. 4).

The recovery from HT- and HL-induced photoinhibition of PSII was measured after transferring leaves to LL ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 22°C for 24 h. The Fv/Fm value of *S. alpina* leaves recovered to a greater extent than that of *R. glacialis* leaves as reported previously (Streb et al. 2003b). In glutathione-depleted leaves of *S. alpina*, the recovery was retarded after 3 h and more significantly after 6-h HL and HT treatment. In glutathione-depleted *R. glacialis* leaves, the recovery of Fv/Fm was retarded only in the 6-h HL and HT treatment (Fig. 5).

The HT-induced photoinhibition was also measured as oxygen evolution capacity at saturating CO_2 after 3-h HL exposure. As shown in Fig. 6, the capacity for oxygen evolution paralleled the Fv/Fm decline in *R. glacialis* leaves. In *S. alpina* leaves, however, the oxygen evolution capacity declined more strongly in the presence of BSO as compared to leaves with normal glutathione content. In addition, oxygen evolution capacity in control leaves remained higher than Fv/Fm values when expressed as % of the untreated control. Within 24 h, both *R. glacialis* and *S. alpina* leaves did not recover from HL- and HT-induced photoinactivation of oxygen evolution irrespective of the glutathione content (Fig. 6).

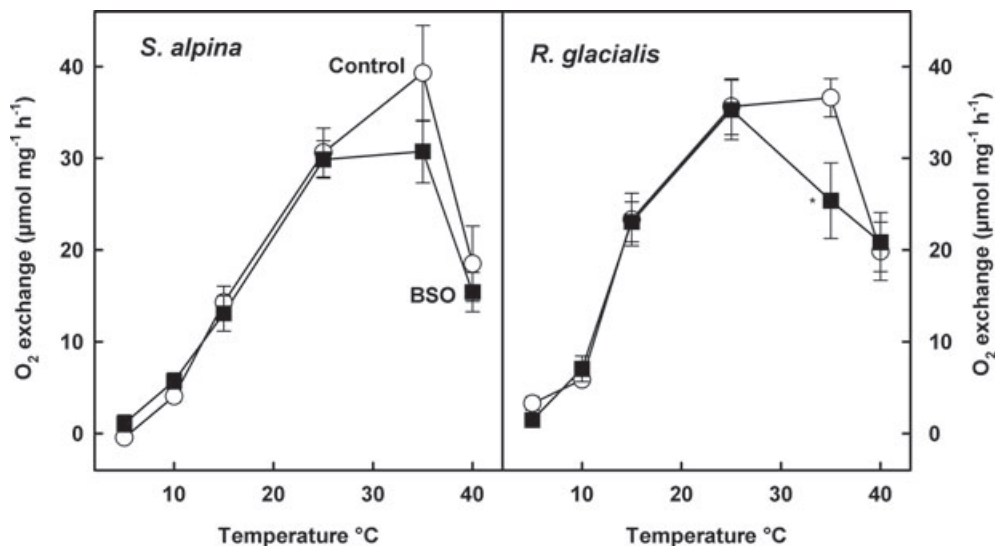


Fig. 3. CO_2 -saturated oxygen evolution in $\mu\text{mol mg}^{-1}$ chlorophyll h^{-1} at $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD of *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* leaves at various measuring temperatures. Leaves were pre-treated for 48 h at ambient temperature and reduced PFD in the absence (H_2O , white) or presence of 10 mM BSO (black). The measurement started at the lowest temperature. Temperatures were changed in darkness. *Level of significance lower than 10%.

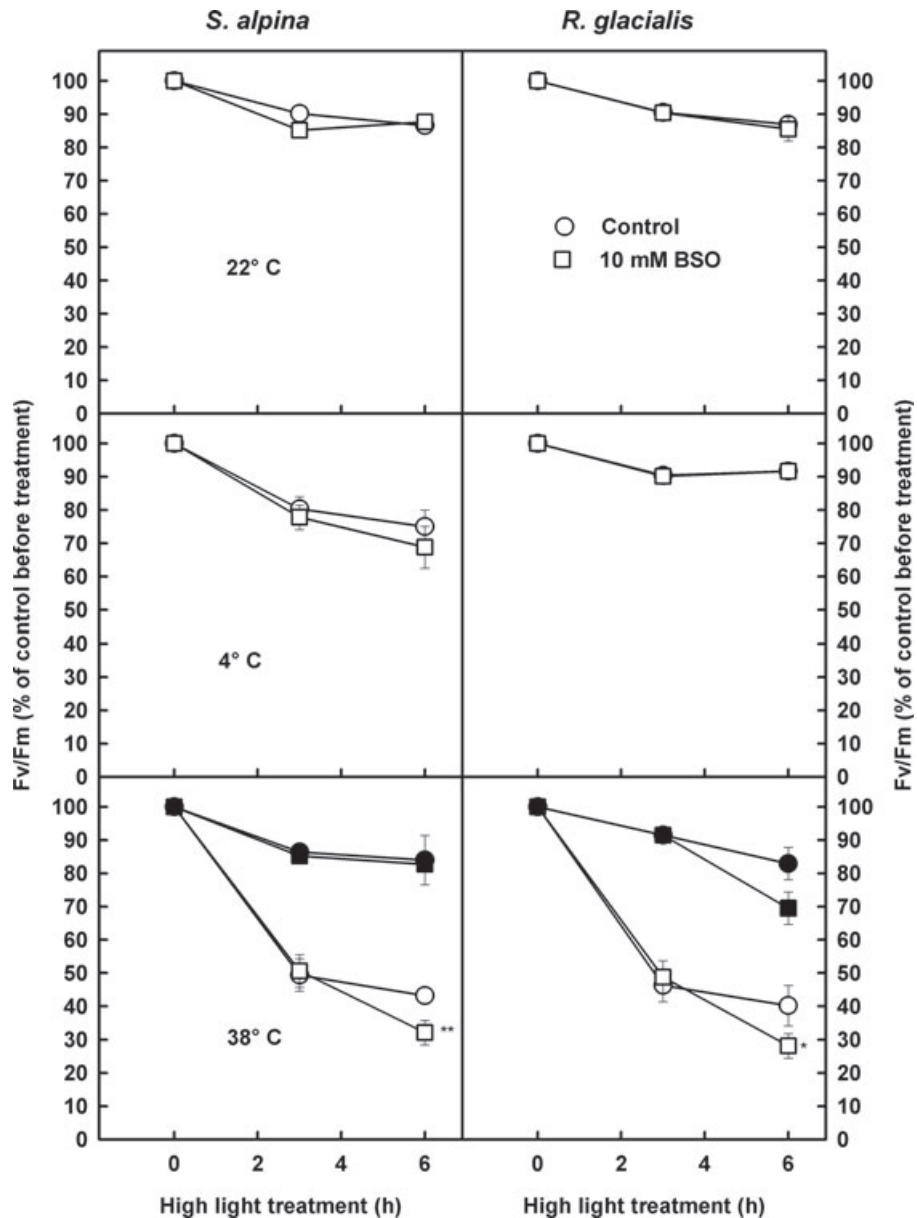


Fig. 4. Fv/Fm ratio as % of the untreated control leaves after 48-h pre-incubation in the absence (H₂O) or presence of 10 mM BSO (absolute values are shown in Table 2). Leaves were illuminated for up to 6 h with a PFD of 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 22°C between 8 and 10°C or at 38°C. At 38°C, leaves were also incubated in darkness (black symbols). *Level of significance lower than 10%; **Lower than 5%.

Effect of low glutathione content on ascorbate content

After transfer to HL, the reduced ascorbate content increased in *S. alpina* and *R. glacialis* leaves. In *S. alpina* leaves, this increase was stronger after incubation for 3 h at 38°C than after a 6-h exposure at 10°C. In *R. glacialis* leaves, a marked increase in the reduced ascorbate content occurred only at LT. A low glutathione content prevented this increase at both temperatures in

S. alpina leaves, but did not affect the ascorbate increase in *R. glacialis* leaves (Fig. 7).

Effect of low glutathione content on other light-sensitive parameters

The enzymes catalase and glycolate oxidase are also susceptible to inactivation by light and their inactivation increase at low glutathione content (Feierabend 2005, Schäfer and Feierabend 2000). Catalase was not

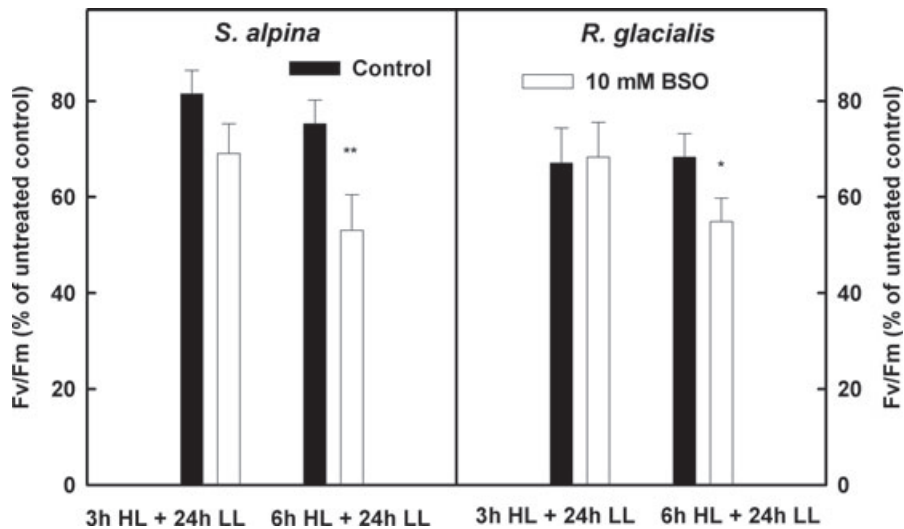


Fig. 5. Recovery of Fv/Fm ratios in % of the untreated control leaves pre-treated for 48 h in the absence (H₂O) or presence of 10 mM BSO (absolute values are shown in Table 2). Leaves were illuminated for 3 or 6 h with a PFD of 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 38°C and subsequently transferred to 22°C and 50–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD for 24 h. *Level of significance lower than 10%; **Lower than 5%.

inactivated by light at LT in *S. alpina* and *R. glacialis* leaves. In *R. glacialis*, its activity increased significantly in untreated control leaves but not in leaves with low glutathione content (Fig. 8). At HT, catalase activity was inactivated. Inactivation and recovery of catalase were independent of the glutathione content in both plant species. Similarly, glycolate oxidase activity decreased at HT in both plant species but recovered only in *S. alpina* leaves (Fig. 8). MDA contents increased during light exposure at LT but slightly decreased during exposure at HT. These changes were not significantly affected by the glutathione contents (Appendix S1).

Light incubation of leaves with normal or low glutathione content at LT or HT did not increase membrane leakage as indicated by conductivity measurements (Appendix S1).

Discussion

BSO pre-incubation affects only glutathione contents

The tripeptide glutathione is involved in stress acclimation and stress tolerance, namely in the maintenance of

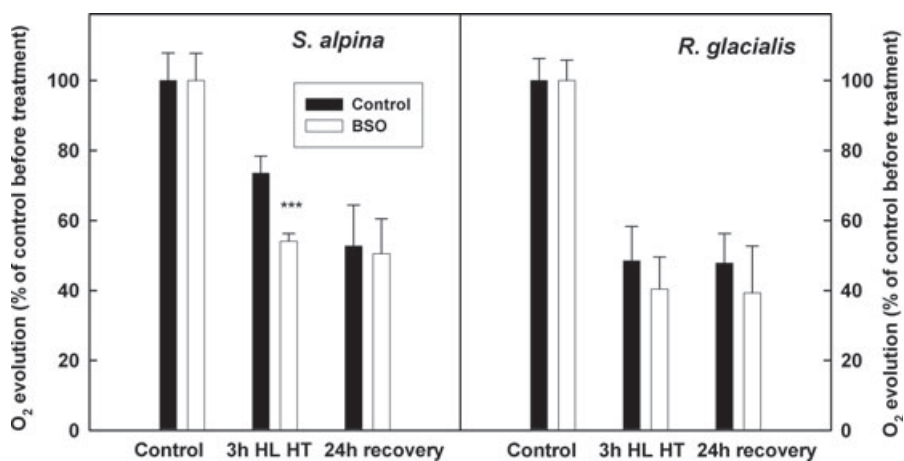


Fig. 6. CO₂-saturated oxygen evolution in % of the untreated control leaves pre-treated for 48 h in the absence (H₂O) or presence of 10 mM BSO. Leaves were illuminated for 3 h with a PFD of 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 38°C and subsequently transferred to 22°C and 50–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD for 24 h. Measurements were performed at 25°C and 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD. ***Level of significance lower than 1%.

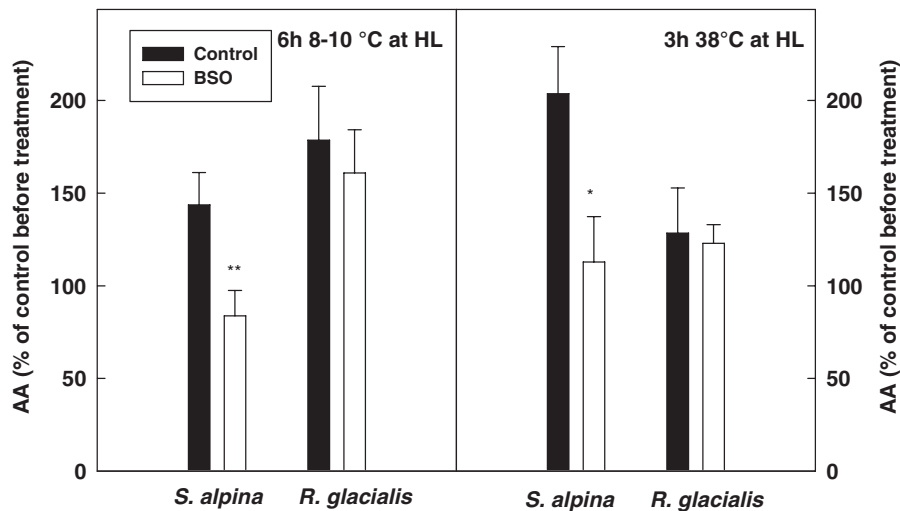


Fig. 7. Reduced ascorbate content in % of the untreated control leaves pre-treated for 48 h in the absence (H₂O) or presence of 10 mM BSO (absolute values are shown in Table 2). Leaves were illuminated with white light of 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 6 h at 8–10°C or for 3 h at 38°C. *Level of significance lower than 10%; **Lower than 5%.

cellular redox homeostasis, stress signaling, regulation of enzyme activities, cellular cycle and, intensively investigated, in antioxidative protection under oxidative and temperature stress conditions (Foyer and Noctor 2011, Foyer and Shigeoka 2011, Meyer 2008, Noctor and Foyer 1998, Rouhier et al. 2008, Tausz et al. 2004). The 50% decrease in glutathione contents in *S. alpina* and *R. glacialis* leaves after 48-h LL pre-incubation (Table 2) can therefore be expected to affect stress acclimation and stress tolerance. As BSO blocks glutathione synthesis but does not affect glutathione degradation (Meister 1983), the decline of glutathione contents reflects the turnover of this antioxidant under non-stress conditions. In both alpine species, this turnover was markedly lower than in non-cold-acclimated rye leaves treated under similar conditions but similarly slow as in cold-acclimated rye leaves (Schäfer and Feierabend 2000, Streb and Feierabend 1999, Streb et al. 1999), suggesting that cold acclimation decreases the glutathione turnover.

In accordance with previous results obtained with rye leaves, the lowered glutathione content did not change other enzyme activities involved in antioxidative protection or photorespiration such as catalase, glycolate oxidase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in both alpine species (Streb and Feierabend 1999). In chilling-sensitive maize leaves, however, BSO treatment reduced the glutathione reductase activity (Kocsy et al. 2000b). Plants with low catalase and ascorbate peroxidase activity show compensatory responses such as increasing glutathione contents or possible enhanced PTOX activity (Queval et al. 2011, Rizhsky et al. 2002, Smith 1985, Smith et al. 1984). PTOX was

reported to increase in winter-acclimated plants and may consume excess electrons under stress conditions (Diaz et al. 2007, McDonald et al. 2011, Quiles 2006, Savitch et al. 2010). High PTOX contents in *R. glacialis* leaves and alternative electron transport to oxygen apart from photorespiration (Streb et al. 2005) suggest participation of PTOX in consuming excess electrons in photosynthesis in alpine plants. Interestingly, PTOX contents were similarly high in *S. alpina* and *R. glacialis* leaves but the PTOX content was not enhanced in glutathione-depleted leaves (Fig. 2). Hence, the mere decrease in glutathione contents did not increase the tested alternative antioxidative scavenging systems (Fig. 2, Table 2), suggesting no simple cross-talk between catalase and ascorbate peroxidase activity and glutathione contents. However, under non-stress conditions, low glutathione contents did not induce oxidative damage, as reflected by unchanged MDA content and membrane leakage, decline of Fv/Fm values or changes in reduced ascorbate or chlorophyll content (Table 2 and Appendix S1). Overall, assuming that the glutathione status serve as a signal or modulator for stress response (Foyer and Noctor 2011, Foyer and Shigeoka 2011, Gomez et al. 2004, Meyer 2008, Rouhier et al. 2008), this is either (1) not visible in the investigated parameters, (2) is not valid in the absence of additional stress signals or (3) is unimportant in already highly stress-acclimated plant species such as the two alpine plant species or cold-acclimated rye.

A possible regulatory action of normal but not of depleted glutathione content was indicated in both species after stress treatments. In *S. alpina* leaves,

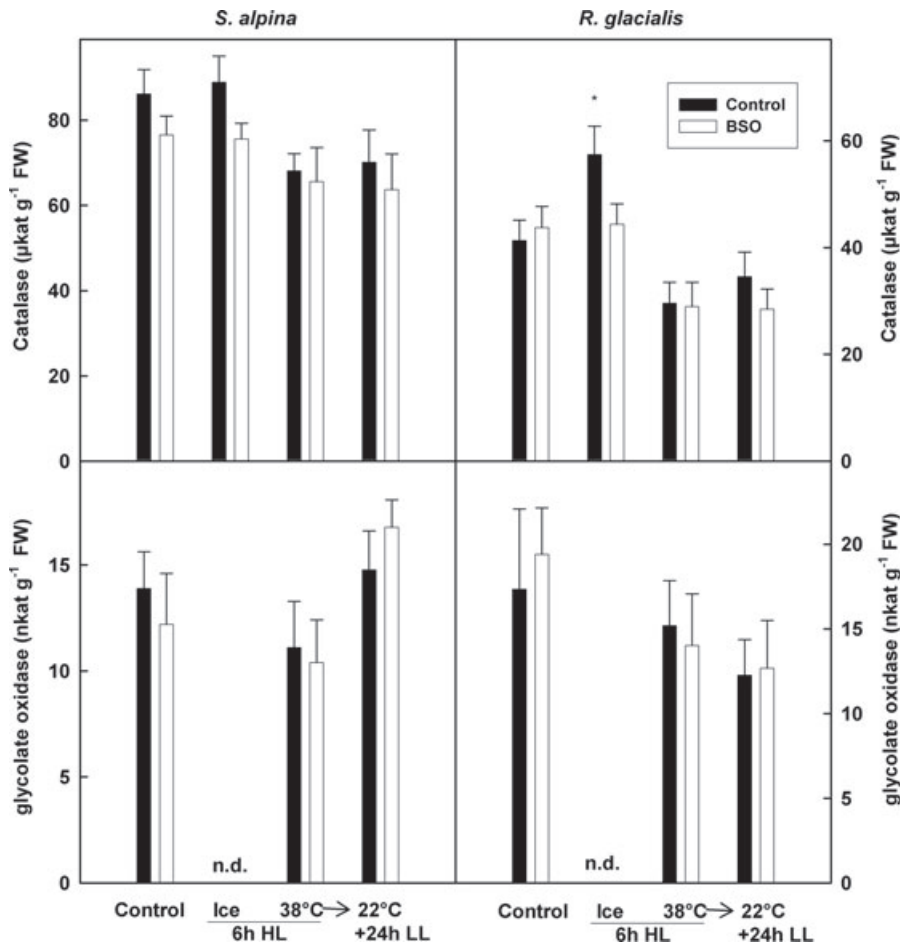


Fig. 8. Catalase and glycolate oxidase activity of *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* leaves after 48 h pre-treatment (control) in the absence (H_2O) or presence of 10 mM BSO and after 6-h illumination with a PFD of $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at $8\text{--}10^\circ\text{C}$ or at 38°C and subsequent recovery at 22°C and $50\text{--}100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD for 24 h. *Level of significance lower than 10%

the HL-induced increase in ascorbate content was alleviated by low glutathione content (Fig. 7). In *R. glacialis* leaves, the LT–HL-induced increase in catalase activity was prevented at low glutathione content (Fig. 8), showing weakening of antioxidative protection in glutathione-depleted leaves compared with control leaves. In conclusion, normal glutathione contents are required to increase alternative antioxidative scavenging by ascorbate in *S. alpina* and catalase in *R. glacialis*.

Glutathione together with antioxidant scavenging enzymes and other antioxidants was thought to be involved in freezing tolerance, as high activities and contents correlated with lower freezing injury (Guy 1990, Kocsy et al. 2000a, Polle et al. 1996, Zhao and Blumwald 1998). A direct correlation between glutathione content and freezing tolerance could, however, not be established (de Kok et al. 1981, Guy et al. 1984). This was confirmed in this study, although a

non-significant decline of the freezing temperature was measured in both species at low glutathione content (Table 2).

Photosynthesis in glutathione-depleted leaves

The photosynthetic oxygen-evolving capacity of leaves at $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and saturating CO_2 as well as leaf respiration were not affected by low compared to normal glutathione content at all measuring temperatures, except for photosynthesis at 35°C (Fig. 3). The temperature limit at which photosynthesis declined markedly in both species was previously determined to be 38°C (Larcher et al 1997, Streb et al. 2003b). Low glutathione contents decreased this temperature limit to at least 35°C . The fact that low glutathione content, compared to leaves with normal glutathione content, did not further decrease photosynthesis at 40°C suggests that at

this temperature other more general effects, such as heat-induced loss of Rubisco activation or decline of electron transport (Haldimann and Feller 2004, Salvucci and Crafts-Brandner 2004, Sharkey 2005), are predominant and affect leaves independent of the glutathione content. At 35°C, glutathione might be required for redox homeostasis and enzyme regulation, as indicated by an increase in sulfhydrylic proteic groups in tobacco cell cultures at this moderate heat shock temperature, but not at a more severe heat shock temperature (Locato et al. 2008). Glutathione might protect oxidation of fructose-1,6-bisphosphatase by glutathionylation or inactivate thioredoxins by glutathionylation, thereby impairing Calvin cycle enzymes (Rouhier et al. 2008).

The effect of low glutathione content at HL and at low and ambient temperature

The requirement of glutathione was further investigated during prolonged HL treatments under conditions occurring naturally during the vegetation period (Table 1). During HL treatment, at LT or at 22°C in the presence or absence of paraquat, low leaf glutathione content did not affect photoinhibition, chlorophyll loss, membrane leakage and lipid peroxidation nor decrease catalase activities (Figs 4 and 8 and Appendices S1 and S2), showing that the weakening of antioxidative protection was entirely compensated by either sufficient carbon assimilation or alternative protection in both plant species. In non-cold-acclimated rye leaves with very low glutathione content, however, catalase and glycolate oxidase inactivation by light is enhanced (Schäfer and Feierabend 2000). Also, in poplar only a very strong increase in glutathione content was able to protect from paraquat-induced oxidative stress, while small variations in glutathione content had no effect (Will et al. 2001).

The effect of low glutathione content at HL and HT

Irrespective of the glutathione content, both species are more sensitive to high as compared to LT (Fig. 3; Streb et al. 2003b). This corresponds to a higher frequency of LT compared to HT events, which have to be tolerated by both species in their natural environment during the vegetation period (Table 1).

As expected from measurements of photosynthesis, HL and HT incubation of glutathione-depleted leaves, compared to control leaves, increased photoinhibition in both species. This was shown by stronger declines of CO₂-saturated photosynthesis and Fv/Fm ratios in leaves with low glutathione content (Figs 4 and 5). Interestingly, also at HT no symptoms of additional, low-glutathione-induced oxidative damage were observed, as indicated

by chlorophyll content, MDA content or membrane leakage (Appendix S1). Obviously, low glutathione content and the associated prevention of compensatory ascorbate increase in *S. alpina* leaves (Fig. 7) did not affect oxidative damage apart from photoinhibition at HL and HT in both alpine species. However, at HT lower ascorbate contents in glutathione-depleted *S. alpina* leaves may limit ascorbate-dependent electron donation to PSII under conditions affecting the water splitting complex or retard recovery from photoinhibition (Tóth et al. 2009, 2011).

In accordance, the recovery of Fv/Fm ratios in glutathione-depleted leaves was retarded after HL and HT treatment compared to leaves with normal glutathione content (Fig. 5), suggesting redox poisoning of PSII repair (Allakhverdiev and Murata 2004, Nishiyama et al. 2005, Takahashi and Badger 2011, Tóth et al. 2011) rather than increase in maximum PSII inactivation. In this context, the stronger PSII inactivation after 6-h HL and HT treatment (Fig. 4) may also result from lower repair activity in glutathione-depleted leaves. In addition, catalase activity recovered more slowly in glutathione-depleted *R. glacialis* leaves after HT-induced photoinactivation, although this response was not significant.

As a lower recovery of Fv/Fm ratios in glutathione-depleted leaves was already apparent after 3-h HT and HL treatment and more significant after 6-h treatment in *S. alpina* than in *R. glacialis* leaves, the high difference in antioxidant scavenging capacity between both species indicates its higher importance in *S. alpina* leaves (Streb et al. 1997, 1998).

The potential target of HT-induced reduction in photosynthesis

The distinct effects of HT- and HL-induced Fv/Fm decline and inhibition of CO₂-saturated photosynthesis and recovery suggest that PSII activity is not the primary target of damage. In *S. alpina* leaves with normal glutathione content, Fv/Fm ratios declined stronger but recovered better than CO₂-saturated oxygen evolution. In normal and glutathione-depleted leaves of both alpine plant species, the recovery of Fv/Fm ratios was marked while CO₂-saturated oxygen evolution remained inactivated, suggesting that PSII photoinhibition do not control overall photosynthesis after HL and HT treatment (Figs 4 and 5). This supports the contention that HT and HL induced inactivation apart from PSII photochemistry in both alpine species, e.g. of Rubisco activase, as suggested for various other plant species with differential temperature acclimation (Haldimann and Feller 2004, Salvucci and Crafts-Brandner 2004).

Conclusion

The absence of a marked effect of glutathione depletion on markers of antioxidative damage suggests that neither the high antioxidant status of *S. alpina* leaves nor the low antioxidative scavenging capacity of *R. glacialis* leaves is required for protection against LT-induced stress in light. The observation that in non-cold-acclimated plants, glutathione protects from damage at LT (Kocsy et al. 2000b) but that in cold-acclimated alpine plants glutathione is required in recovery from HT-induced damage suggests a role of antioxidants for repair and redox homeostasis (Takahashi and Badger 2011) in a temperature regime to which plants are not naturally acclimated to. *Soldanella alpina*, as compared to *R. glacialis* leaves, have to survive more extreme temperature and light stress events at the natural growing site (Table 1) and high antioxidative protection capacities may allow *S. alpina* to tolerate these extremes while *R. glacialis* just avoid them.

Acknowledgements – We thank Jürgen Feierabend and Gabriel Cornic for critical reading of the manuscript, Marcel Kunz for the gift of antibodies against the PTOX protein, Rosine de Paepe for her help in Western blot determination and the Station Alpine du Lautaret for working facilities.

References

- Allakhverdiev SI, Murata N (2004) Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* 1657: 23–32
- Amako K, Chen GX, Asada K (1994) Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol* 35: 497–504
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391–396
- Baptist F, Flahaut C, Streb P, Choler P (2010) No increase in alpine snowbed productivity in response to experimental lengthening of the growing season. *Plant Biol* 12: 755–764
- Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9970–9974
- Cournac L, Redding K, Ravenel J, Rumeau D, Josse EM, Kuntz M, Peltier G (2000) Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J Biol Chem* 275: 17256–17262
- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM (1998) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol* 116: 1351–1357
- de Kok LJ, de Kan PJJ, Tanczos OG, Kuiper PJC (1981) Sulphate induced accumulation of glutathione and frost-tolerance of spinach leaf tissue. *Physiol Plant* 53: 435–438
- Demmig-Adams B, Adams WW III, Heber U, Neimanis S, Winter K, Krüger A, Czygan FC, Bilger W, Björkman O (1990) Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiol* 92: 293–301
- Diaz M, De Haro V, Munoz R, Quiles MJ (2007) Chlororespiration is involved in the adaptation of *Brassica* plants to heat and high light intensity. *Plant Cell Environ* 30: 1578–1585
- Falk S, Maxwell DP, Laudenschlager DE, Huner NPA (1996) Photosynthetic adjustment to temperature. In: Baker NR (ed) *Advances in Photosynthesis, Photosynthesis and the Environment*, Vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 367–385
- Feierabend J (2005) Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. In: Smirnoff N (ed) *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishers, Oxford, pp 101–140
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* 155: 2–18
- Foyer CH, Shigeoka S (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol* 155: 93–100
- Gerhardt B, Beevers H (1968) Influence of sucrose on protein determination by the Lowry procedure. *Anal Biochem* 24: 337–339
- Gomez LD, Noctor G, Knight MR, Foyer CH (2004) Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *J Exp Bot* 55: 1851–1859
- Guy CL (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 187–223
- Guy CL, Carter JV, Yelenosky G, Guy CT (1984) Changes in glutathione content during cold acclimation in *Cornus sericea* and *Citrus sinensis*. *Cryobiology* 21: 443–453
- Haldimann P, Feller U (2004) Inhibition of photosynthesis by high temperature in oak (*Quercus pubescens* L.) leaves grown under natural conditions closely correlates with a reversible heat-dependent reduction of the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Cell Environ* 27: 1169–1183
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances

- assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604–611
- Hüve K, Bichele I, Tobias M, Niinemets Ü (2006) Heat sensitivity of photosynthetic electron transport varies during the day due to changes in sugars and osmotic potential. *Plant Cell Environ* 29: 212–228
- Hüve K, Bichele I, Rasulov B, Niinemets Ü (2011) When it is too hot for photosynthesis: heat-induced instability of photosynthesis in relation to respiratory burst, cell permeability changes and H₂O₂ formation. *Plant Cell Environ* 34: 113–126
- Kim K, Portis AR Jr (2005) Temperature dependence of photosynthesis in *Arabidopsis* plants with modifications in Rubisco activase and membrane fluidity. *Plant Cell Physiol* 46: 522–530
- Kocsy G, Szalai G, Vagujfalvi A, Stehli L, Orosz G, Galiba G (2000a) Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* 210: 295–301
- Kocsy G, von Ballmoos P, Suter M, Rüeeggesser A, Galli U, Szalai G, Galiba G, Brunold C (2000b) Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. *Planta* 211: 528–536
- Kocsy G, Galiba G, Brunold C (2001) Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiol Plant* 113: 158–164
- Körner C (1999) *Alpine Plant Life. Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Larcher W, Wagner J, Lütz C (1997) The effect of heat on photosynthesis, dark respiration and cellular ultrastructure of the arctic-alpine psychrophyte *Ranunculus glacialis*. *Photosynthetica* 34: 219–232
- Larcher W, Kainmüller C, Wagner J (2010) Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora* 205: 3–18
- Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol* 128: 682–695
- Locato V, Gadaleta C, De Gara L, De Pinto MC (2008) Production of reactive species and modulation of antioxidant network in response to heat shock: a critical balance for cell fate. *Plant Cell Environ* 31: 1606–1619
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, van Montagu M, Inze D (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* 49: 649–667
- McDonald AE, Ivanov AG, Bode R, Maxwell DP, Rodermeil SR, Hüner NPA (2011) Flexibility in photosynthetic electron transport: the physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochim Biophys Acta* 1807: 954–967
- Meister A (1983) Selective modifications of glutathione metabolism. *Science* 220: 472–477
- Meyer AJ (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J Plant Physiol* 165: 1390–1403
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2005) Inhibition of the repair of photosystem II by oxidative stress in cyanobacteria. *Photosynth Res* 84: 1–7
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249–279
- Öquist G, Hüner NPA (2003) Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Ann Rev Plant Biol* 54: 329–355
- Polle A, Kröniger W, Rennenberg H (1996) Seasonal fluctuations of ascorbate-related enzymes: acute and delayed effects of late frost in spring on antioxidative systems in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Cell Physiol* 37: 717–725
- Porra RJ (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination chlorophylls a and b. *Photosynth Res* 73: 149–156
- 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
- Queval G, Jaillard D, Zechmann B, Noctor G (2011) Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ* 34: 21–32
- Quiles MJ (2006) Stimulation of chlororespiration by heat and high light intensity in oat plants. *Plant Cell Environ* 29: 1463–1470
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermeil S, Inze D, Mittler R (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J* 32: 329–342
- Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot J-P (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Ann Rev Plant Biol* 59: 143–166
- Salvucci ME, Crafts-Brandner SJ (2004) Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiol* 134: 1460–1470
- Savitch LV, Ivanov AG, Krol M, Sprott DP, Öquist G, Hüner NPA (2010) Regulation of energy partitioning and alternative electron transport pathways during cold acclimation of lodgepole pine is oxygen dependent. *Plant Cell Physiol* 51: 1555–1570
- Schäfer L, Feierabend J (2000) Photoinactivation and protection of glycolate oxidase in vitro and in leaves. *Z Naturf* 55: 361–372

- Schöner S, Krause GH (1990) Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. *Planta* 180: 383–389
- Sharkey TD (2005) Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant Cell Environ* 28: 269–277
- Smith IK (1985) Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol* 79: 1044–1047
- Smith IK, Kendall AC, Keys AJ, Turner JC, Lea PJ (1984) Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci* 37: 29–33
- Streb P, Cornic G (in press) Photosynthesis and antioxidant protection in alpine herbs. In: C Lütz (ed) *Plants in Alpine Regions, Cell Physiology of Adaptation and Survival Strategies*. Springer Verlag, Wien, New York
- Streb P, Feierabend J (1999) Significance of antioxidants and electron sinks for the cold-hardening-induced resistance of winter rye leaves to photo-oxidative stress. *Plant Cell Environ* 22: 1225–1237
- Streb P, Feierabend J, Bligny R (1997) Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant Cell Environ* 20: 1030–1040
- Streb P, Shang W, Feierabend J, Bligny R (1998) Divergent strategies of photoprotection in high-mountain plants. *Planta* 207: 313–324
- Streb P, Shang W, Feierabend J (1999) Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress. *Plant Cell Environ* 22: 1211–1223
- Streb P, Aubert S, Gout E, Bligny R (2003a) Reversibility of cold- and light-stress tolerance and accompanying changes of metabolite and antioxidant levels in the two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *J Exp Bot* 54: 405–418
- Streb P, Aubert S, Bligny R (2003b) High temperature effects on light sensitivity in the two high mountain plant species *Soldanella alpina* (L) and *Ranunculus glacialis* (L). *Plant Biol* 5: 432–440
- Streb P, Josse E-M, Gallouët E, Baptist F, Kuntz M, Cornic G (2005) Evidence for alternative electron sinks to photosynthetic carbon assimilation in the high mountain plant species *Ranunculus glacialis*. *Plant Cell Environ* 28: 1123–1135
- Takahashi S, Badger MR (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci* 16: 53–60
- Tausz M, Sircelj H, Grill D (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J Exp Bot* 55: 1955–1962
- Tóth SZ, Puthur JT, Nagy V, Garab G (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiol* 149: 1568–1578
- Tóth SZ, Nagy V, Puthur JT, Kovács L, Garab G (2011) The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. *Plant Physiol* 156: 382–392
- Wildi B, Lütz C (1996) Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant Cell Environ* 19: 138–146
- Will B, Jouanin L, Rennenberg H (2001) Protection from paraquat-mediated photo-oxidative stress by glutathione in poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) plants. *Plant Biol* 3: 272–278
- Wise RR (1995) Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth Res* 45: 79–97
- Wise RR, Olson AJ, Schrader SM, Sharkey TD (2004) Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. *Plant Cell Environ* 27: 717–724
- Zhao S, Blumwald E (1998) Changes in oxidation-reduction state and antioxidant enzymes in the roots of jack pine seedlings during cold acclimation. *Physiol Plant* 104: 134–142

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Appendix S1. Chlorophyll content, malondialdehyde content and membrane leakage of *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* leaves.

Appendix S2. Influence of BSO pre-treatment on paraquat-induced decline of Fv/Fm ratio, total chlorophyll content (Chl), catalase activity and membrane leakage in leaves of *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*.

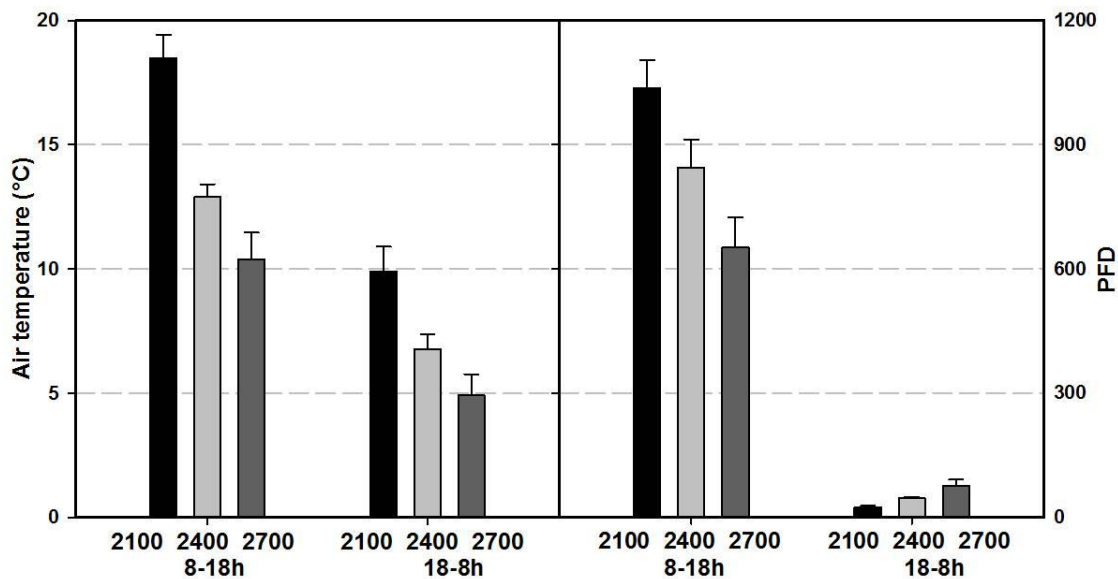
Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

3. *Ranunculus glacialis* physiology doesn't change with altitude

The absence of marked effects of glutathione depletion on markers of oxidative damage suggests that neither the high antioxidant capacity of *Soldanella alpina* leaves, nor the low antioxidative capacity of *Ranunculus glacialis* leaves is required for the protection against low temperature events combined to high light exposure. In both species, glutathione appears to be required to allow recovery from high temperature and high light induced photoinhibition. In particular, *Soldanella alpina* can experience extremely high temperatures combined to high light events at its natural growing site.

Supplementary experiments to results shown in Laureau et al. 2011 were performed with *Ranunculus glacialis* leaves to understand how the growing altitude modifies photosynthetic activity, i.e. if *Ranunculus glacialis* leaves are able to acclimate to lower altitude where temperatures are supposed to be higher. Since *Ranunculus glacialis* in nature is not found at altitudes lower than 2400 m, plants were transferred into pots and grown in the botanical garden of the Col du Lautaret at 2100 m altitude. These plants were compared to plants grown in full sunlight at 2400 m and 2700 m altitude.

Results



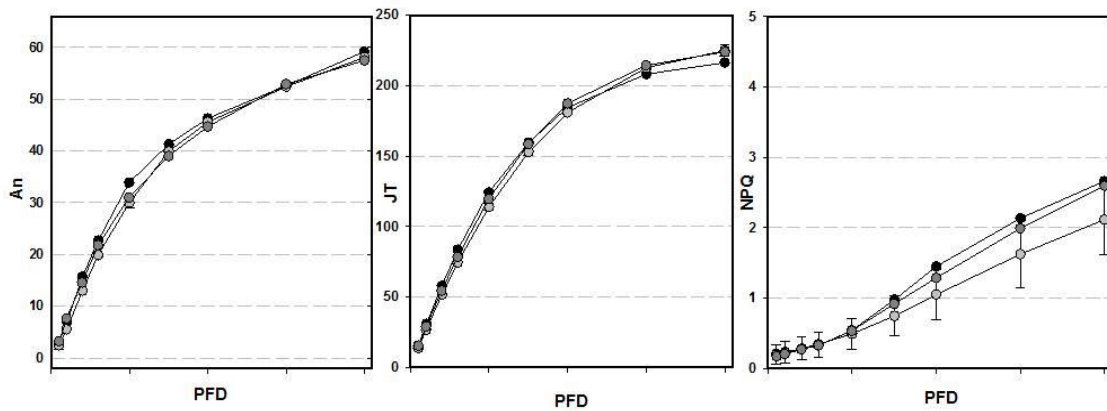
(Fig.1). Mean air temperature at 2100, 2400 and 2700 meters elevation and mean PFD during the day (8h-18h) and the night (18h-8h) were recorded. Data collection was performed from July 4, 2009 to July 27, 2009 for 2100 meters elevation site; from June 23, 2008 to August, 2008 for 2400 meters elevation site, and from July 4, 2011, to July 28, 2011 for 2700 meters elevation.

Temperature and light conditions varied markedly at different altitudes at the Galibier pass. Measurements were taken during the vegetation period from the end of June to the beginning of August at all sites. As expected, at the lowest growing site the lowest leaf temperature was higher than at the highest growth site. Similarly at 2100 m the mean temperature was higher and temperature events above 30 °C in high light occurred regularly. Even air temperature extremes above 40 °C were measured at 2100 m, while those conditions were clearly absent at the highest investigated altitude. Overall these results confirm that low mean and low temperature extremes increase with altitude while the opposite was true for high temperature events. Interestingly, the mean PFD at the leaf level was highest at low altitude and lowest at the highest altitude. In contrast, maximum PFDs were higher at high altitude. If acclimation is induced, one can expect low temperature acclimation at high altitude, but high light acclimation at low altitude in this investigation.

	2000 m	2400 m	2700 m
Lowest air temperature	-0,783°C	-2,104°C	-2,216°C
Hours with mean air temperature < 10°C and light intensity > 1000 PFD $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0	12	2
Most extreme combination of low air temperature and high PFD	12,5 °C – 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	6,3°C – 1642 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0,726°C – 1541 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Highest air temperature	43,02°C	35,49°C	29,84°C
Hours with mean air temperature > 30°C and light intensity > 1000 PFD $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	3	0	0
Most extreme combination of high air temperature and high PFD	43,02 °C – 2018 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	35, 5°C – 2128 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	29,84°C – 2720 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

(Table1.) Single climatic and light events in *Ranunculus glacialis* leaves measured at two natural growing sites (2400m and 2700m) and one artificial growing site (2100m), between Alpine station above the Lautaret pass and the Galibier pass in the French Alps. Data collection was performed from July 4, 2009 to July 27, 2009 for 2100 meters elevation site; from June 23, 2008 to August , 2008 for 2400 meters elevation site, and from July 4, 2011, to July 28, 2011 for 2700 meters elevation. Air temperature and PFD at leaf level were recorded each 30 second during the main vegetation period.

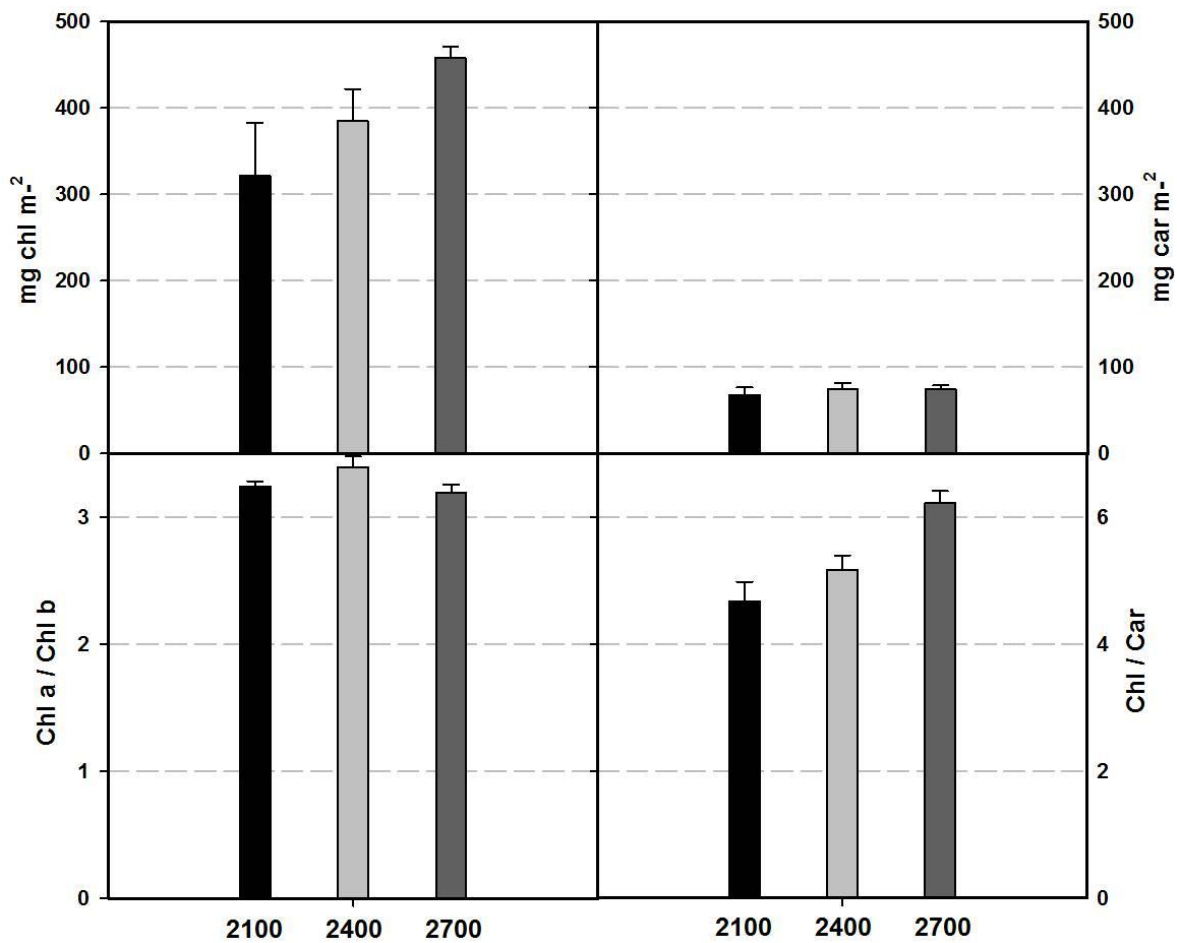
To compare photosynthetic capacity in *Ranunculus glacialis* plants grown under different temperature regimes, net carbon assimilation (A_n) was measured as a function of PFD in an atmosphere of 2000 ppm CO_2 . Under this condition A_n was not different in *Ranunculus glacialis* leaves from all altitudes. Similarly, also JT was the same and NPQ only slightly lower at 2400 meters elevation.



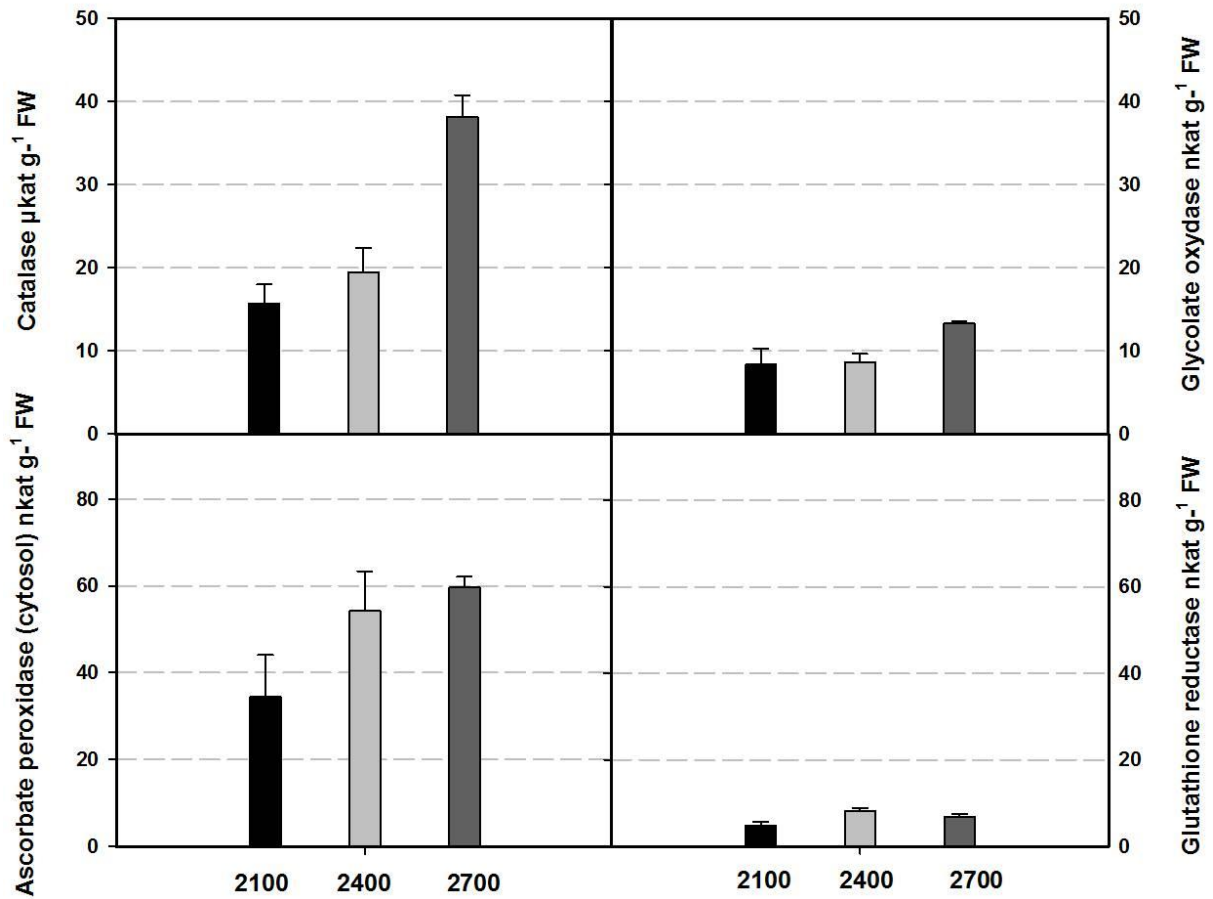
(Fig. 2) Net carbon assimilation (A_n), total electron flux (J_T) and non photochemical quenching of fluorescence in *Ranunculus glacialis* leaves from 2700 meters elevation (dark grey circles), from 2400 meters elevation (pale grey circles) and from 2100 meters elevation (black circles) as a function of photon flux density (PFD), in an atmosphere containing 21% O_2 and 2000 ppm CO_2 . The leaf temperature was maintained between 22 and 24°C. Mean values of at least 3 independent experiments and standard errors are shown for experiments made with leaves from 2100 and 2400 meters elevation, but only one experiment was performed with leaves from 2700

Plants from higher altitude increase their chlorophyll content on a leaf area basis while the carotenoid content was kept constant. Consequently ratios of Chl/Car increase with altitude while Chla/b ratios remained unchanged (Fig.3).

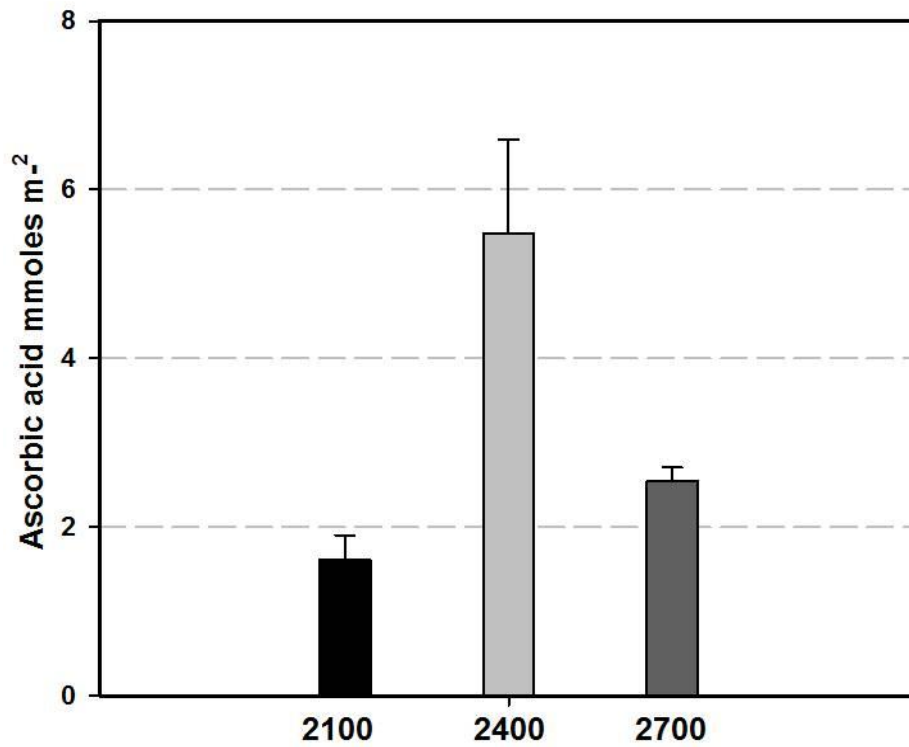
Parameters of antioxidative protection like catalase and ascorbate peroxidase activity increase with altitude, while glycolate oxidase and glutathione reductase were not markedly modified by the altitude. Only ascorbate contents were highest at intermediate altitude (Fig. 4 & 5).



(Fig.3) Chlorophyll and carotenoid contents in *Ranunculus glacialis* leaves collected at three different growing sites: 2100, 2400 and 2700 meters elevation. Mean values of at least 3 independent experiments and standard errors are show.



(Fig.4). Catalase, glycolate oxidase, ascorbate oxidase and glutathione reductase activities of *Ranunculus glacialis* leaves collected at three different growing sites: 2100, 2400 and 2700 meters elevation. Mean values of at least 3 independent experiments and standard errors are show.



(Fig.4) Ascorbate contents in *Ranunculus glacialis* leaves collected at three different growing sites: 2100, 2400 and 2700 meters elevation. Mean values of at least 3 independent experiments and standard errors are show.

Discussion

The investigation of plants from different altitudes was performed to induce different acclimation levels due to climatic differences. However, neither photosynthesis nor other parameters measured in these experiments were markedly different in *Ranunculus glacialis* from varying altitude. A slight increase of antioxidative enzyme activities with altitude might indicate higher stress events at high altitude. However, Öquist & Huner (2003) have shown that temperature and light acclimation can interact. In this case lower temperature at high altitude was combined with lower PFD and higher temperature at low altitude with higher PFD. Since high light and low temperature induce similar acclimation responses (Streb & Cornic 2012) one can conclude that higher PFD at low altitude compensates for higher leaf temperatures. The fact that mean PFD at low altitude was highest can be explained by the exposition of the botanical garden directly to the south.

Chapitre 5

/

Chapter 5

**PTOX as a security valve for excess excitation
energy in the alpine plant species *Ranunculus
glacialis***

1. Introduction

Ranunculus glacialis, a cold acclimated species, didn't show any marked difference in photosynthetic nor antioxidative capacity with altitude. As *Ranunculus glacialis* shows very weak antioxidative capacity but very high PTOX contents and the supposed PTOX activity, as a plastoquinol oxidase, was suggested to avoid overreduction of the photosynthetic electron transfer chain (Diaz et al. 2007, Savitch et al. 2010). PTOX activity may thus allow acclimation to high light and low temperature environments.

To investigate the importance of PTOX activity for tolerance against photoinhibition at low temperatures and under high light, *Ranunculus glacialis* leaves were grown under shading to decrease PTOX contents within leaves. Photosynthetic characteristics were investigated with gas exchange combined to chlorophyll fluorescence measurements.

2. **Plastid terminal oxidase (PTOX) as a security valve for excess excitation energy in the alpine plant species *Ranunculus glacialis* L.**

Plastid terminal oxidase (PTOX) as a security valve for excess excitation energy in the alpine plant species *Ranunculus glacialis* L.

Constance Laureau^a, Rosine De Paepe^b, Gwendal Latouche^a, Maria Moreno-Chacón^a, Marcel Kuntz^c, Gabriel Cornic^a, Peter Streb^{a*}

^a *Université Paris-Sud 11, Ecologie, Systématique et Evolution, UMR-CNRS 8079, Bâtiment 362, 91405 Orsay cedex, France.*

^b *Université Paris-Sud 11, Institut de Biologie des Plantes, UMR-CNRS 8618, Bâtiment 630, 91405 Orsay cedex, France.*

^c *Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, UMR 5168, CEA/CNRS/INRA/Université Joseph Fourier, 17 rue des Martyrs, 38 054 Grenoble cedex 9, France*

* Corresponding author: peter.streb@u-psud.fr

Abstract

R. glacialis leaves were tested for their PTOX content and electron flow to photorespiration and to alternative acceptors. In shade-leaves, the PTOX and NDH content were markedly lower than in sun-leaves. Carbon assimilation/light and C_i response curves were not different in sun- and shade-leaves but photosynthetic capacity was highest in sun-leaves. Shade- and sun-leaves had a similar photorespiratory capacity. J_T and qL were higher in sun- than in shade-leaves when electron transport to assimilation and to photorespiration was blocked by glycolaldehyde and, in addition, when the Mehler reaction was blocked with DBMIB. Shade-leaves with low PTOX content can transport up to $23 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons to alternative acceptors but only $14 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons to PTOX. The electron consumption capacity of PTOX is at least double as high in sun-leaves. The results suggest that PTOX can act as a security valve under conditions where the plastoquinone pool is highly reduced. Such conditions can occur frequently in alpine climates. Under conditions of non-limited assimilation and photorespiration, PTOX activity is rather low.

Key words:

Alpine plants, alternative electron flow, photorespiration, PTOX, stress tolerance

Abbreviations:

A_N , net carbon assimilation; APX, ascorbate peroxidase; C_a , external CO₂ partial pressure; C_i , internal CO₂ partial pressure; DBMIB, 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone; J_O , electron flux to oxygen; J_T , total electron flux at PSII; NDH, NAD(P)H dehydrogenase; NPQ , non-photochemical fluorescence quenching; Φ_{CO_2} , quantum efficiency of CO₂ assimilation; Φ_{PSII} , quantum efficiency of PSII; PFD , photon flux density; $PRcap$, photorespiration capacity; PTOX, plastid terminal oxidase; qL , fraction of open PSII centers; R_d , dark respiration, R_L , light respiration; ROS, reactive oxygen species

Introduction

Alpine plants growing at high altitude have to cope regularly with extreme climatic events such as very high *PFDs* combined with either low or high temperatures (Körner 1999; Laureau, Bligny & Streb 2011; Streb & Cornic 2012). Combinations of high *PFDs* with temperature extremes can lead to high rates of chloroplastic electron transport which may induce the formation of ROS and possible destructions (Asada 1999; Ort & Baker 2002; Suzuki & Mittler 2006). Numerous mechanisms to balance electron transport with light absorption and carbon assimilation were demonstrated in several plant species, including the dissipation of excess absorbed energy as heat (Li et al. 2009) as well as the consumption of excess electrons by photorespiration (Ort & Baker 2002; Streb et al. 2005; Streb & Cornic 2012), by the Mehler reaction (Asada 1999; Ort & Baker 2002), by the malate valve (Scheibe 2004) and electron cycling around PSI to increase the proton gradient (Cornic et al. 2000). Furthermore, several scavenging systems can keep the ROS accumulation under control to prevent ROS-induced damage (Noctor & Foyer 1998; Asada 1999). While several of these protective mechanisms increase in response to low temperature acclimation (Ensminger, Berninger & Streb in press), their abundance is variable in different alpine species and they are also widely distributed in plant species incapable to survive alpine climates (Streb & Cornic 2012). Moreover, the artificial decline of glutathione in two alpine plant species, one with strong and the other with weak (*R. glacialis*) antioxidative protection capacity, does not affect their susceptibility to low-temperature induced photoinhibition (Laureau, Bligny & Streb 2011).

These findings raise the question whether alpine plants balance excess excitation energy with an alternative, more specific security valve, which is quantitatively less important in non-alpine species. According to previous investigations, all alpine plant species investigated for PTOX contain high amounts of this protein. In addition, the PTOX protein content increases with the altitude where these plants were collected from (Streb et al. 2005; Laureau, Bligny & Streb 2011). In lowland plants, the amount of PTOX is generally low (Lennon, Prommeenate & Nixon 2003; Streb et al. 2005) and their capacity to accept excess photosynthetically generated electrons was estimated to be insignificant (Ort & Baker 2002). However, in plant species acclimated to stress conditions like cold, heat, drought salinity and high light, the amount of PTOX protein increases strongly, suggesting a potential involvement in stress tolerance (reviewed by: McDonald et al. 2011; Sun & Wen 2011). In salt stressed *Thelluginiella* up to 30 % of photosynthetic

electron flow was estimated to be attributed to PTOX (Stepien & Johnson 2009).

The PTOX protein can transfer electrons from plastoquinone to molecular oxygen thus forming H₂O (Carol & Kuntz 2001). PTOX is involved in chloroplast development. During carotenoid synthesis, desaturase reactions require plastoquinone and are driven by a redox chain in which PTOX is likely to reoxidize reduced plastoquinone (Carol & Kuntz 2001; Kuntz 2004). The lack of PTOX leads to the variegated leaf phenotype of the *Arabidopsis* mutant *immutans* and the tomato mutant *ghost*, in which the bleached sectors originate early during chloroplast biogenesis as a consequence of a deficit in carotenoid content (Carol & Kuntz 2001). In mature leaves, PTOX is no longer needed for carotenoid synthesis, but it may act as a security valve to keep the plastoquinone pool oxidised and to prevent photooxidative damage under stress conditions (McDonald et al. 2011; Sun & Wen 2011; Streb & Cornic 2012). In *Chlamydomonas* cells, two different PTOX proteins have been recently described, one is involved in carotenoid synthesis and the other in plastoquinone oxidation during photosynthesis (Houille-Vernes et al. 2011). In contrast, in *Arabidopsis* leaves PTOX is a single copy gene (Fu, Aluru & Rodermel 2009). However, while in some transgenic plants with high PTOX content enhanced plastoquinone oxidation was shown (Joet et al. 2002), experiments with others either did not confirm increased oxidation of the plastoquinone pool (Rosso et al. 2006) or showed enhanced superoxide formation (Heyno et al. 2009).

R. glacialis leaves have one of the highest PTOX contents measured in higher plants so far. Growth at low altitude at elevated temperature decreased the PTOX content and increased the susceptibility to photoinhibition (Streb et al. 2003, 2005). In the present investigation, environmental growth conditions modulating the PTOX content of *R. glacialis* leaves were tested. Leaves with high and low PTOX content were investigated for their alternative electron flow to oxygen and their PTOX activity under conditions of limited carbon assimilation and photorespiration. The function of PTOX as a security valve in relation to photorespiration under high mountain stress conditions is discussed.

Material and Methods

Plant material and growing conditions

Ranunculus glacialis (L) plants were collected in the French Alps at approximately 2400 m altitude as described in Laureau, Bligny & Streb (2011). Whole plants were transferred into pots with soil from the growing site in the first year and either further cultivated at 2400 m altitude in full sunlight (sun-leaves), protected by green nylon (high density polyethylene) to reduce the incident *PPFD* by 50 % (shade-leaves) or transferred to a growing chamber at low altitude at 6° C and 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ *PPFD* (24h). Measurements of mature leaves started the second year and were repeated for at least two subsequent years. Only leaves fully developed under the described conditions were used for the experiments.

Microclimatic conditions

The leaf-temperature and the *PPFD* arriving at the leaf level were measured every 30 s during the first week after leaf expansion from shade- and sun-leaves with a Campbell datalogger (CR23X) as described in Laureau, Bligny & Streb (2011). For shade- and sun-leaves, temperature and *PPFD* were measured on three independent leaves. From these measurements mean hourly leaf-temperature and *PPFD* during the day (8-18h) and night (18-8h) were calculated and shown in addition to the highest and lowest measured values.

Gas exchange and fluorescence measurements

CO₂ net uptake by leaves in combination with chlorophyll fluorescence emission was measured using a LI-6400 (LiCor Inc., Lincoln, NE, USA) equipped with a leaf chamber fluorometer 6400-40 essentially as described in Priault et al. (2006a). Oxygen evolution was determined with a Hansatech oxygen electrode and a LD2 chamber as described in Streb, Feierabend & Bligny (1997). Chlorophyll fluorescence was additionally measured with a PAM2000 (Walz, Germany).

For measurements with the LI-6400, intact plants in pots were transferred in the morning

to the laboratory. After insertion of attached leaves into the leaf chamber (2 cm²), leaves were dark-adapted for at least 30 min to measure dark respiration, F_o and F_m . Afterwards, leaves were acclimated to 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PFD . After stabilization of A_N and stomatal conductance (approximately 30 min) A_N/PFD and A_N/C_i response curves in 21 % oxygen and 1 % oxygen were measured. Acclimation was repeated when experimental conditions (gas, PFD) were changed. Gas exchange measurements were taken after the signal stabilized (between 5 and 8 min after changing PFD or C_a). A saturating light flash, followed by darkness and far red light was given after gas exchange measurements to determine F_m' and F_o' , while F' was measured continuously. The F_o , F_m , F_o' , F_m' and F' nomenclature were taken from Baker (2008). The whole Licor leaf-chamber was maintained in a second closed thermostated chamber to avoid any external gas exchange. Measurements were done at leaf temperatures between 22 and 23 °C and a leaf water pressure deficit of approximately 1 kPa in an atmosphere of 21 % or 1 % oxygen.

From chlorophyll fluorescence measurements F_v/F_m ratios of dark adapted leaves, $\Phi PSII$, qL and NPQ was calculated (Baker 2008). From A_N measurements ΦCO_2 was calculated as:

$$(1) \Phi CO_2 = A_N - R_L / \text{Leaf-absorption} \times PFD$$

where a leaf-absorption of 0.8 in sun- and shade-leaves was measured as described previously (Streb et al. 2005) and R_L corresponds to respiration in light. R_L was estimated by the method from Laisk (1977), as described in Priault et al. (2006b) for shade- and sun-leaves. A representative measurement is shown in supporting informations (Fig. S1). A mean R_L of 66% of R_d was determined in several independent experiments in sun- and shade-leaves and used for the calculations. R_d values in 1 % oxygen were found to be identical to R_d in 21 % oxygen.

ΦCO_2 and $\Phi PSII$ measurements in 1 % oxygen were used to calculate the relationship between both quantum efficiencies (supporting information: Fig. S2). A regression line of $\Phi PSII = 8.303 \Phi CO_2 + 0.012$ was determined for shade- and sun-leaves and used to recalculate electron transport at PSII (J_T) in 21 % oxygen from ΦCO_2 as described in Streb et al. (2005). From recalculated J_T , electron flux to oxygen (J_o) was calculated according to Valentini et al. (1995), considering that carbon assimilation and photorespiration are the only reactions competing for electrons as:

$$(2) J_O = 2/3 (J_T - 4(A_N - R_L))$$

The difference of total electron transport in 21 % oxygen and 1 % oxygen ($J_{T21\%} - J_{T1\%}$) at identical C_i was read manually from blotted graphics (Fig.3B)

Oxygen evolution was measured with detached leaves at saturating CO_2 , 25 °C and 900 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PFD.

Fluorescence measurements with the PAM2000 were done at 25 °C with detached leaves kept on moistened filter paper or enclosed in plastic bags. For measurements of F_o and F_m , leaves were kept for 30 min in darkness. F_o' was measured after the light flash and the arrest of actinic light and short illumination with far-red light. Calculations were as described above, except that J_T was calculated as:

$$(3) J_T = \Phi_{PSII} \times 0.5 \times 0.8 \times PFD$$

Inhibitor treatment

Leaves were incubated in small petri dishes in 10 ml solution in the presence of 3 mM lincomycin, 100 mM glycolaldehyde or 30 μM DBMIB. For lincomycin treatment, leaves were kept for 1h in darkness before fluorescence measurements and light exposure. Leaves were kept in lincomycin during the whole experiment (Streb, Shang & Feierabend 1999). For treatment in the presence of glycolaldehyde and DBMIB, leaves were vacuum-infiltrated for 1 min and further incubated for 10 min in darkness. Leaves were then removed from the inhibitor solution and experiments were done on wet filter-paper. The successful uptake of glycolaldehyde and DBMIB was verified by measuring the oxygen evolution capacity in saturating CO_2 . No net oxygen evolution was observed after the inhibitor treatments. The experiments were repeated independently at least 4 times.

Immunodetection

Leaves (1g fresh weight) were frozen in liquid nitrogen at their growing site or after gas exchange measurements. Frozen leaves were ground into a fine powder and suspended in extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) containing 10% sucrose, 0.2% β -mercaptoethanol and 500 μM Pefablock (Roche diagnostics GmbH, Mannheim,

Germany). After 20 min stirring at 4 °C and centrifugation at 10 000g for 20 min at 4°C, the pellet was resuspended in 200-600µl extraction buffer containing 1% SDS and 1% Triton-X-100. After further 20 min stirring at 20 °C the centrifugation was repeated at 20°C and the supernatant containing membrane proteins were further used.

Proteins (40-60 mg) were fractionated by denaturing SDS-PAGE as described by Laemmli (1970) using 13% acrylamide (w/v) gels, and transferred onto nitrocellulose membranes by electroblotting in Western transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% v/v methanol). Blotted nitrocellulose membranes were blocked with 5% w/v non-fat milk powder and incubated with different antibodies. Polyclonal rabbit antibody against *Arabidopsis thaliana* PTOX was used as described by Cournac et al. (2000) at a final dilution of 1:2000. Other antibodies were diluted as: NDH-H polyclonal rabbit antibody to 1:3000 (Rumeau et al. 2005); FNR polyclonal rabbit antibody to 1:2000; CP43 polyclonal rabbit antibody to 1:3000; PSAB polyclonal rabbit antibody to 1:1000. Loading was on the basis of the same membrane protein content (40 µg). Immunodetection was performed using the ECL Western blotting kit (Amersham Bioscience) as recommended by the suppliers. Digital images of the intensity of the chemiluminescence signal were obtained with the ImageJ free software. Blots were repeated twice from extractions of three different leaves.

Biochemical measurements

Leaves (0.3g) were collected in the morning. Fresh leaves were extracted in 50 mM potassium-phosphate (pH 7.5) or frozen in liquid nitrogen, grinded to a powder and suspended in 2 % metaphosphoric acid + 2 mM EDTA as described in Laureau, Bligny & Streb (2011).

Leaves from the metaphosphoric acid extract were used for ascorbate measurements as described in Laureau, Bligny & Streb (2011).

Leaves from the phosphate extract were used for all other measurements. Total soluble protein content, and activities of catalase, glycolate oxidase and APX were measured as described by Streb, Feierabend & Bligny (1997).

Chlorophyll and carotenoid contents were measured in 80 % acetone extracts using the

absorption coefficients for chlorophyll from Porra (2002). Total carotenoid contents were estimated by absorption at 453nm subtracting the Chla+b content according to Röbbelen as described in Urbach, Rupp & Sturm (1983).

Results

High PTOX content is not induced by low temperature

Mature newly developed leaves from the growing chamber were tested for their PTOX content and compared to mature leaves collected at the natural growing site at 2400 m altitude. As shown in Fig. 1(A and B), leaves from the growing chamber had no detectable PTOX content. This result shows that low temperature is not sufficient to induce high PTOX contents in *R. glacialis* leaves.

Induction of high PTOX contents requires high *PF*D during leaf development

Shading at the natural growing site reduced the mean absorbed *PF*D by approximately 50 % and the maximum absorbed *PF*D by more than 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, compared to sun-leaves (Tab. 1). However maximum *PF*D at the leaf level was still as high as 1700 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in shade-leaves. The mean leaf temperature was, in contrast, similar in shade- and sun-leaves but the leaf-temperature extremes were slightly higher in sun-leaves (Tab. 1). Only leaves developed under continuous shading or in full sunlight were used for further investigations.

The PTOX content was much higher in sun- than in shade-leaves (Fig. 1A) showing that high *PF*Ds are required to induce high PTOX contents in *R. glacialis*. PTOX contents were compared to other photosynthetic protein complexes participating in linear and cyclic electron flow. Contents of FNR and PSAB (PSI) were similar in shade- and sun-leaves. Contents of CP43 (PSII) were higher in sun-leaves increasing the ratio of PSI/PSII in shade-leaves (Fig. 1 B and C). The ratio of PSII/PTOX was maintained in shade- and sun-leaves. In contrast, significant contents of the NDH protein were only found in sun-leaves (Fig. 1B and C). Lower PSII contents in shade-leaves were accompanied by 30 % lower maximum rates of J_T , measured at 2000 ppm C_a and at a *PF*D of 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, as compared sun-leaves (Tab. 2).

Photosynthetic characteristics of shade- and sun-leaves

R. glacialis leaves developed in the shade had a slightly reduced leaf thickness, a proportionally lower chlorophyll a+b content and a lower chlorophyll a/b ratio compared to sun-leaves. The chlorophyll/carotenoid ratio remained unchanged (Tab. 2). The total soluble protein content was markedly lower in shade- compared to sun-leaves and, proportionally, the activities of catalase and APX declined. Notably, the activity of glycolate oxidase was not different in shade- compared to sun-leaves and total ascorbate contents (reduced + oxidised) were significantly higher in shade-leaves (Tab. 2). The maximum photosynthetic activity and the maximum total electron transport rate at high *PPFD* and high CO₂ partial pressure in 21 % oxygen was 30% lower in shade- than in sun-leaves (Tab. 2).

The photosynthetic light response curve at atmospheric CO₂ partial pressure (380 ppm *C_a*) was not significantly different in shade- and sun-leaves but even slightly lower in the latter (Fig. 2). Also values of *NPQ* and *qL* did not differ markedly in shade- und sun-leaves as a function of *PPFD* under atmospheric conditions but in contrast to *A_N* they were slightly higher in sun-leaves (Supporting information Fig. S3A,B).

Estimation of electron flux to photorespiration and alternative electron flux

Carbon assimilation in shade- and sun-leaves was measured as a function of internal CO₂ molar ratio (*C_i*) at 21 % and at 1 % oxygen and a *PPFD* of 750 μmol m⁻²s⁻¹ (Fig. 3A). *A_N* of shade- and sun-leaves was not different as a function of *C_i* at either 21 % or 1 % oxygen. At low *C_i*, carbon assimilation was strongly stimulated in an atmosphere of 1 % oxygen, demonstrating photorespiratory activity as expected in C3 plants. At high *C_i*, photorespiration was completely suppressed as shown by nearly identical *A_N* under 21% and 1 % oxygen in shade- and sun-leaves (Fig. 3A). In 21 % oxygen, total photosynthetic electron transport (*J_T*) was slightly higher in sun- compared to shade-leaves but slightly lower in 1 % oxygen. Consequently, the difference of *J_T* between 21 % and 1 % oxygen (*J_{T21%}*-*J_{T1%}*), which represents the total electron flux to oxygen, was higher in sun- than in shade leaves (Fig. 3B).

At the highest *C_i*, where photorespiration is suppressed, (*J_{T21%}*-*J_{T1%}*)_{min} allows the estimation of alternative electron flow to oxygen, which was higher in sun- than in shade

plants (Tab. 3, Fig. 3B). However, the small difference of alternative electron flow to oxygen between shade- and sun-leaves did not correlate to the great difference of PTOX contents and do not exclude the activity of other electron acceptors like the Mehler reaction. A higher possible contribution of alternative electron flux to PTOX in sun- compared to shade-leaves was only indicated by a very small difference of qL , despite identical NPQ and slightly higher J_T , indicating that sun-leaves may keep the oxidation state of plastoquinone higher than shade-leaves (Fig. 3B and supporting information Fig. S3 B,D).

Assuming that alternative electron flux to oxygen is independent of C_i , electron transport to photorespiration and the capacity of photorespiration ($PRcap$) can be calculated by the difference of $(J_{T21\%}-J_{T1\%})_{max} - (J_{T21\%}-J_{T1\%})_{min}$. Interestingly, a $PRcap$ of $56 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in sun-leaves and $48 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in shade-leaves matched well with electron consumption of photorespiration as estimated by glycolate oxidase activity (Tab. 3). For comparison, $PRcap$ was also estimated in 21 % oxygen from J_O of the C_i response curve (supporting information: Fig. S4B). This estimation depends only on J_T and A_N in 21 % oxygen (Valentini et al. 1995) and resulted in a slightly higher $PRcap$.

Alternative electron flux in detached leaves

In order analyse alternative electron flux to oxygen, shade- and sun-leaves were detached and the fluorescence parameters J_T , qL and NPQ were measured in four different conditions at four different low intensity $PFDs$ to mitigate strong photoinhibition. (1) Control shade- and sun-leaves kept on moist filter paper, had identical J_T , NPQ and qL under all $PFDs$ applied (Fig. 5-7) and results were similar to those obtained with attached leaves (supporting information. Fig. S3). (2) Enclosing leaves into tightly closed plastic bags, prevented gas exchange and allowed electron flux to photorespiration and to alternative electron acceptors. Under these conditions J_T and qL were significantly higher in sun- than in shade-leaves, while NPQ was highest in shade-leaves at higher PFD (Figs. 4-6). (3) The incubation of leaves in glycolaldehyde blocked Rubisco activity but not electron flux to the Mehler reaction and to PTOX. Under these conditions J_T was lowest in all samples (Fig. 4). In shade-leaves, J_T was significantly lower than in sun-leaves and did not respond to increasing PFD . In accordance, qL was lower in shade- than in sun-leaves but NPQ was higher (Figs 5-6). (4) Finally, electron transport at the cytochrome

b₆/f complex was blocked by DBMIB, thus allowing electron flux to PTOX only. In the presence of DBMIB, sun-leaves had higher J_T than shade-leaves, which peaked at 38 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons, while the capacity of shade-leaves was less than half as high (Fig. 4). In addition, sun-leaves kept the oxidation state of PSII higher as indicated by a much higher qL than in shade-leaves (Fig. 5). While NPQ was negligible under very low $PF D$, some significant NPQ could be measured in sun-leaves at the highest $PF D$ applied (Fig. 6). The successful application of glycolaldehyde and DBMIB was confirmed by measuring oxygen evolution at saturating CO_2 . After the application of both inhibitors no net oxygen exchange was measured.

Photoinhibition of shade- and sun-leaves

The above treatments in the presence or absence of inhibitors or in plastic bags were done during 2 h illumination (30 min for every $PF D$). At the end of this period, leaves were incubated in darkness and illuminated with far red light before re-evaluating the F_v/F_m ratio, indicating photoinhibition. Some slight and significant photoinhibition was only measured in leaves treated with glycolaldehyde but F_v/F_m ratios were always slightly lower in shade- than in sun-leaves (Fig. 7). The maximal photoinhibition of PSII was then tested in the presence of lincomycin to prevent the new synthesis of the D1 protein by exposing leaves for up to 6 h to 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ $PF D$. Under these conditions photoinhibition of shade-leaves was significantly higher than in sun-leaves (Fig. 8).

Discussion

PTOX is induced by high light

R. glacialis leaves required very high *PFDs* during growth at ambient temperature with mean daytime *PFDs* above $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and peak *PFDs* up to $2800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ to induce high PTOX protein contents (Fig. 1A and B). Growth at low temperature and low *PFD* was insufficient to induce a high PTOX content. Reducing the mean growth *PFD* by 50 % with peak *PFDs* up to $1700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ markedly reduced the PTOX protein content (Fig. 1). This shows that light and not temperature is the primary factor inducing PTOX in *R. glacialis* leaves. However, it remains to be investigated whether a high mean daytime *PFD* is required to induce high PTOX contents, or whether this results from short periods of very high *PFD* exposure of leaves. Nevertheless, the results are consistent with numerous reports showing that PTOX is induced under various stress conditions, including cold, heat and salinity in combination with light (for review see: McDonald et al. 2011; Sun & Wen 2011; Streb & Cornic 2012). According to the concept presented by Huner, Öquist & Sarhan (1998), acclimation responses are induced under conditions of high excitation pressure, suggesting that light and additional environmental stress interacts.

Characteristics *R. glacialis* shade- and sun-leaves

In the present investigation, shade-leaves were compared to sun-leaves. It should be noted that growth *PFD* for *R. glacialis* shade-leaves were untypically high (mean daytime *PFD* of more than $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) which exceeds most *PFDs* used for growth in a greenhouse, even for sun-plants. However, shade- compared to sun-leaves showed several typical acclimation responses to low *PFD* (Walters 2005), concerning leaf-thickness, chl_{a+b} content, chl_{a/b} ratio and R_d . The soluble protein content and enzyme activities were lower in shade- than in sun-leaves except for glycolate oxidase activity (Table 2). Since one reported function of PTOX is its involvement in carotenoid synthesis in developing leaves (Carol & Kuntz 2001), it should be noted that the Chl/Carotenoid ratio was the same in shade- and sun-leaves and therefore not related to the PTOX content of mature leaves (Table 2). As described by Walters (2005), the ratio of PSI/PSII is higher

and the PSII content lower in shade- than in sun-leaves. This was also the case in *R. glacialis*. Interestingly, the PTOX content paralleled the PSII content in shade- and sun-leaves, suggesting that PTOX protein synthesis is coordinated with the PSII content in *R. glacialis*. In contrast, strongly increased PTOX protein contents were measured in a tobacco PSBA deletion mutant (Baena-Gonzalez et al. 2003). Similar to PTOX, also the NDH-protein content was much higher in sun- than in shade-leaves (Fig. 1B). A coordinated appearance of high PTOX and high NDH-protein contents were previously observed in *R. glacialis* (Streb et al. 2005) and in studies by Quiles and co-workers, presenting evidence for PTOX act as security valve (e.g.: Quiles 2006; Diaz et al 2007; Ibanez et al. 2010) but not in PTOX-over expressing *Arabidopsis* (Rosso et al. 2006).

Interestingly, A_N/PFD and A_N/C_i response curves did not differ markedly in shade- and sun-leaves in an atmosphere of either 21% or 1 % oxygen but A_N as a function of PFD was even slightly lower in sun-leaves. The applied experimental conditions were obviously insufficient to limit the photosynthetic capacity in *R. glacialis* shade and sun-leaves. This was confirmed by a higher maximum A_N of shade- and sun-leaves at 2000 ppm C_a and 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PFD as compared to A_N measured in PFD and C_i response curves (Tab. 2).

PTOX and photorespiration as electron acceptors

An excess electron flux of approximately 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ under non-photorespiratory conditions (high C_i) was taken previously as indicator of PTOX activity in *R. glacialis* leaves with high PTOX content (Streb et al. 2005). This was postulated, because *R. glacialis* leaves were very susceptible to methylviologen, an herbicide which increases superoxide formation in the Mehler reaction (Streb et al. 1998). In accordance, *R. glacialis* leaves have only low activities of superoxide dismutase. Ascorbate, the key antioxidant of the water-water cycle (Asada 1999); is localized nearly exclusively in chloroplasts of *R. glacialis*, where it oxidises almost completely during the day at high altitude (Streb, Feierabend & Bligny 1997). The higher ascorbate content of shade- compared to sun-leaves may therefore indicate a higher capacity for ascorbate oxidation in the water-water cycle in the former. This is consistent with the idea that PTOX is upregulated under conditions where antioxidative scavenging is limiting, like in the tobacco double mutant lacking catalase and APX (Rizhsky et al. 2002).

To investigate possible PTOX activity, electron flux to oxygen was estimated in shade- and sun-leaves (Tab. 3). The $PRcap$, as estimated from J_T at 21 % and 1 % oxygen and from glycolate oxidase activity, was $56 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in sun-leaves and slightly lower in shade leaves ($48 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons) corresponding well to previously published results (Streb et al. 2005). An independent calculation of $PRcap$ from measurements at 21 % oxygen only, using J_O according to Valentini et al. (1995), confirmed the small difference of $PRcap$ between shade- and sun-leaves, but estimated a higher $PRcap$ in both. Since the model of Valentini et al. (1995) suggests that electrons are only distributed between A_N and photorespiration, this approach does not take alternative electron flux into account and probably overestimates $PRcap$. Nevertheless, similar to the calculation shown in Tab. 3, also the calculation of J_O results in a significant electron flux to oxygen at high C_i , which is obviously not related to photorespiration. While photorespiration is the major electron sink in *R. glacialis* next to A_N , up to $23 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in shade-leaves and up to $28 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in sun-leaves were consumed by oxygen in the absence of photorespiration (Tab. 3). If PTOX was this electron acceptor, a higher difference of electron flow between sun- and shade leaves would be expected, due to their marked different PTOX contents (Fig. 1). Either electron flow to the Mehler reaction and/or the Malate valve is more active in shade-leaves, or PTOX activity is not saturated in sun-leaves under the applied conditions. The maximum electron consumption activity of NADP-malate dehydrogenase, activated under midday high light conditions at the Galibier pass, was previously determined to be approximately $8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons (Streb et al. 2005) and is probably lower in shade- than in sun-leaves. Similarly, a very low electron flux to the Mehler reaction was shown by O_2 -uptake measurements in several plant species but only at limiting CO_2 (Driever & Baker 2011). The lower photoinhibition in lincomycin treated sun-leaves (Fig. 8) suggests, however, less harmful ROS formation which may be related to higher PTOX contents. Since superoxide formation at PSI can inactivate PSII (Krieger-Liszkay, Kos & Hideg 2011) and was shown to occur in methylviologen-treated *R. glacialis* leaves (Streb et al. 1998), alternative electron flow in shade-leaves might be partially due to the Mehler reaction.

Electron transport under conditions of suppressed A_N and photorespiration

In order to demonstrate the different activity of PTOX in sun- and shade-leaves, fluorescence measurements were performed with detached leaves, which were either enclosed in tight plastic bags to block any gas exchange but allowing photorespiration at the CO_2 compensation point, or pre-treated in the presence of glycolaldehyde or DBMIB. Glycolaldehyde is an inhibitor of phosphoribulokinase, depleting ribulose-bis-phosphate contents and by this way blocking A_N as well as photorespiration (Wiese, Shi & Heber 1998). DBMIB blocks plastoquinone oxidation by the Rieske centre of the cytochrome b_6/f complex (Trebst 1980; Yan, Kurisu & Cramer 2006), therefore allowing only electron flow from PSII to PTOX (Joet et al. 2002). The successful application of both inhibitors was verified by a net oxygen exchange of zero, demonstrating that for every O_2 produced by PSII another O_2 was consumed while electron transport was active. Detached control leaves showed no difference of J_T , qL and NPQ between shade- and sun-leaves at all PFD s applied and results were consistent with those of attached leaves in the light response curve. Blocking gas exchange in plastic bags, resulted in a marked decline of J_T compared to control leaves but higher J_T with increasing PFD , a higher qL at high PFD and a lower NPQ in sun- compared to shade-leaves. In the absence of photorespiration and carbon assimilation, in glycolaldehyde treated leaves, J_T was lowest. However, a significant build up of the pH gradient is indicated by a relative high NPQ even at low PFD . Under this condition, NPQ was higher but J_T and qL were lower in shade- than in sun-leaves (Figs. 4-6). This is consistent with a higher PTOX activity in sun- compared to shade-leaves, since the pH gradient remains lower when electrons are consumed by PTOX instead of electron transfer to O_2 by the Mehler reaction. Furthermore, this result indicates that PTOX was active and not cyclic electron flow via NDH. If NDH would transfer electrons back from PSI to plastoquinone, sun-leaves should have a higher activity, due to their much higher NDH content (Fig. 1B and C). If true, qL in sun-leaves should be lower and NPQ higher than in shade-leaves, which was not the case. Finally, in the presence of DBMIB, qL and NPQ was lowest from all experimental conditions but J_T was markedly higher in sun- than in shade-leaves. Up to $38 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons were transported in sun-leaves. In shade-leaves, the maximum J_T remained at $14 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons. Furthermore, qL indicated a higher PSII oxidation state in sun-leaves and at the highest PFD applied, NPQ was double as high in sun- compared to shade-leaves. This is consistent with a higher J_T to PTOX in sun-leaves. It

should be noted that under the applied conditions no significant photoinhibition was observed in sun and shade-leaves except in the presence of glycolaldehyde. Photoinhibition was, however, always higher in shade- than in sun-leaves and can be explained by enhanced superoxide formation at PSI in shade-leaves.

Conclusions and implications for stress tolerance at high altitude and the contribution of PTOX

The induction of high PTOX content by high *PFDs* at high altitude was demonstrated in this manuscript and distinguishes *R. glacialis* from experiments with *Arabidopsis*. In *Arabidopsis* mutants, PTOX activity as security valve was not detectable or J_T was even higher in double or triple mutants lacking PTOX and cyclic electron flow (Rosso et al. 2006; Okegawa, Kobayashi & Shikanai 2010). This lack of PTOX-security-valve-function may be simply related to low PTOX contents of *Arabidopsis* WT with a low catalytic capacity (Ort & Baker 2002), while comparative PTOX quantification showed a much higher PTOX content in *R. glacialis* than in other alpine species and even in PTOX overexpressing tomato (Streb et al. 2005). However, several results of Okegawa, Kobayashi & Shikanai (2010) cannot be explained by low PTOX capacity but depends rather on complex, yet unidentified regulation of electron transport in the presence and absence of PTOX and cyclic electron flow. The measured electron fluxes in this study, allow distinguishing between photorespiration and PTOX capacities in relation to maximum J_T in shade- and sun-leaves. Taking the maximum measured J_T as electron transport capacity (Tab. 2), the estimated electron consumption by photorespiration (Tab. 3) and the electron flux in the presence of DBMIB as PTOX activity (Fig. 4), sun-leaves can transport relatively less electrons to photorespiration (22 % compared to 26 % in shade-leaves) but approximately double as much electrons to PTOX (15% compared to 8% in shade-leaves) (Tab. 4). This shows that high light acclimation in *R. glacialis* leaves does favour an up regulation of PTOX. However, the PTOX capacity of *R. glacialis* leaves is lower than those of salt stressed *Thelluginella* (Stepien & Johnson 2009).

As long as carbon assimilation and photorespiration are not limiting electron consumption PTOX activity remains low. Under these conditions, differences between shade- and sun-leaves with different PTOX contents are hardly measurable, in agreement with the concept of PTOX activity as security valve. Under conditions of blocked assimilation,

differences in PTOX content of *R. glacialis* became visible in higher qL and higher J_T in high-PTOX leaves. Such conditions occur regularly in high altitude climates due to excessive *PFD* and temperature extremes impairing carbon assimilation and photorespiration (Laureau et al. 2011; Streb & Cornic 2012). Also the Mehler reaction suppresses PTOX activity, as shown in glycolaldehyde leaves, but increases photoinhibition. This implies that superoxide formation by PTOX itself does not occur in *R. glacialis*, as it has been previously reported in transgenic tobacco leaves (Heyno et al. 2009). However, under conditions of a highly reduced plastoquinone pool, PTOX contributes significantly to electron consumption, suggesting that the affinity of PTOX for plastoquinone is rather low. Similarly, PTOX activity was demonstrated in *Chlamydomonas* cytochrome b_6/f defective mutants (Houille-Vernes et al. 2011) and in chloroplasts and leaves from PTOX-transformed tobacco in the presence of DBMIB (Joet et al. 2002). In this context, cyclic electron flow around PSI by NDH or by other pathways could contribute to activate PTOX, because cyclic electron flow increases the reduction state of the plastoquinone pool.

Acknowledgements

We thank Dominique Rumeau and Anja Krieger-Liszkay for antibodies against NDH-H, and FNR, Richard Bligny and Serge Aubert for their help to make experiments in the Alps possible and the alpine laboratory of the Col du Lautaret for working facilities and a great atmosphere.

References

- Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **50**, 601-639.
- Baena-Gonzalez E., Allahverdiyeva Y., Svab Z., Maliga P., Josse E.-M., Kuntz M., Mäenpää P., Aro E.-M. (2003) Deletion of the tobacco plastid psbA gene triggers an upregulation of the thylakoid-associated NAD(P)H dehydrogenase complex and the plastid terminal oxidase (PTOX). *The Plant Journal* **35**, 704-716.
- Baker N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 89-113.
- Carol P., Kuntz M. (2001) A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends in Plant Science* **6**, 31-36.
- Cornic G., Bukhov N.G., Wiese C., Bligny R., Heber U. (2000) Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C3 plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta* **210**, 468-477.
- Cournac L., Redding K., Ravenel J., Rumeau D., Josse E.M., Kuntz M., Peltier G. (2000) Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17256-17262.
- Diaz M., De Haro V., Munoz R., Quiles M.J. (2007) Chlororespiration is involved in the adaptation of *Brassica* plants to heat and high light intensity. *Plant Cell and Environment* **30**, 1578-1585.
- Driever St.M., Baker N.R. (2011) The water-water cycle in leaves is not a major alternative electron sink for dissipation of excess excitation energy when CO₂ assimilation is restricted. *Plant, Cell and Environment* **34**, 837-846.
- Ensminger I., Berninger F., Streb P. (2012) Response of photosynthesis to low temperature. In: *Ecophysiology of Photosynthesis* (J. Flexas, F. Loreto & H. Medrano eds.) Cambridge University Press **Chapt. 19**.

- Fu A., Aluru M., Rodermel S.R. (2009) Conserved active site sequences in Arabidopsis plastid terminal oxidase (PTOX). *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 22625-22632
- Heyno E., Gross C.M., Laureau C., Culcasi M., Pietri S., Krieger-Liszkay A. (2009) Plastid alternative oxidase (PTOX) promotes oxidative stress when overexpressed in tobacco. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 31174-31180.
- Houille-Vernes L. Rappaport F., Wollmann F.-A., Alric J., Johnson X. (2011) Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **108**, 20820-20825.
- Huner N.P.A., Öquist G., Sarhan F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* **3**, 224-230
- Ibanez H., Ballester A., Munoz R., Quiles M.J. (2010) Chlororespiration and tolerance to drought, heat and high illumination. *Journal of Plant Physiology* **167**, 732-738.
- Joet T., Genty B., Josse E.-M., Kuntz M., Cornac L., Peltier G. (2002) Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 31623-31630
- Körner C. (1999) Alpine plant life. Functional plant ecology of high mountain ecosystems. *Springer Verlag Berlin Heidelberg*.
- Krieger-Liszkay A., Kos P.B., Hideg E. (2011) Superoxide anion radicals generated by methylviologen in photosystem I damage photosystem II. *Physiologia Plantarum* **142**, 17-25.
- Kuntz M. (2004) Plastid terminal oxidase and its biological significance. *Planta* **218**, 896-899.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685
- Laisk A.K. (1977) Kinetics of photosynthesis and photorespiration in C3 plants. *Nauka, Moscow*.

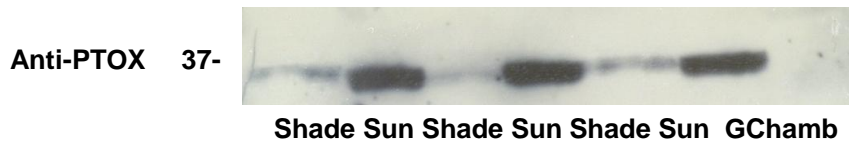
- Laureau C., Bligny R., Streb P. (2011) The significance of glutathione for photoprotection at contrasting temperatures in the alpine plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *Physiologia Plantarum* **143**, 246-260
- Lennon A.M., Prommeenate P., Nixon P.J. (2003) Location, expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, Ndh and IMMUTANS, in higher-plant plastids. *Planta* **218**, 254-260.
- Li Z., Wakao S., Fischer B.B., Niyogi K.K. (2009) Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 239-260.
- McDonald A.E., Ivanov A.G., Bode R., Maxwell D.P., Rodermel S.R., Hüner N.P.A. (2011) Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 954-967.
- Noctor G., Foyer C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.
- Okegawa Y., Kobayashi Y., Shikanai T. (2010) Physiological links among alternative electron transport pathways that reduce and oxidize plastoquinone in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **63**, 458-468.
- Ort D.R., Baker N.R. (2002) A photoprotective role of O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 193-198.
- Porra R.J. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* **73**, 149-156.
- 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. *Journal of Experimental Botany* **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 CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3195-3207.
- Quiles M.J. (2006) Stimulation of chlororespiration by heat and high light intensity in oat plants. *Plant Cell and Environment* **29**, 1463-1470.
- Rizhsky L., Hallak-Herr E., van Breusegem F., Rachmilevitch S., Barr J.E., Rodermel S., Inze D., Mittler R. (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant Journal* **32**, 329-342.
- Rosso D., Ivanov A.G., Fu A., Geisler-Lee J., Hendrickson L., Geisler M., Stewart G., Krol M., Hurry V., Rodermel S.R., Maxwell D.P., Hüner N.P.A. (2006) IMMUTANS does not act as a stress-induced safety valve in the protection of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis* during steady-state photosynthesis. *Plant Physiology* **142**, 574-585.
- Rumeau D, Bécuwe-Linka N., Beyly A., Louwagie M., Garin J., Peltier G. (2005) New Subunits NDH-M , -N , and -O , encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *The Plant Cell* **17**, 219-232.
- Scheibe R. (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia Plantarum* **120**, 21-26.
- Stepien P., Johnson G.N. (2009) Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *Thellungiella*: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant Physiology* **149**, 1154-1165.
- Streb P., Aubert S., Gout E., Bligny R. (2003) Reversibility of cold- and light-stress tolerance and accompanying changes of metabolite and antioxidant levels in the two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *Journal of Experimental Botany* **54**, 405-418.
- Streb P., Cornic G. (2012) Photosynthesis and antioxidative protection in alpine herbs. In: *Plants in Alpine regions: Cell physiology of adaptation and survival strategies Springer WienNewYork (Ed. C.Lütz)* 75-97.

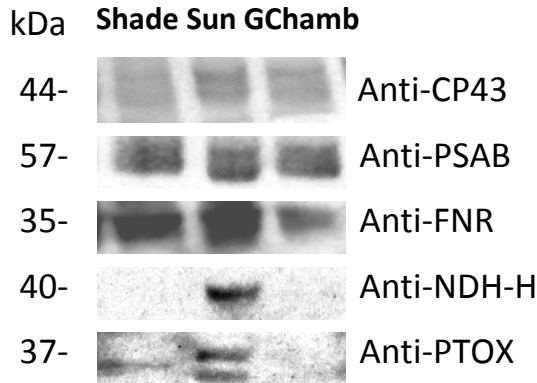
- Streb P., Feierabend J., Bligny R. (1997) Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant Cell and Environment* **20**, 1030-1040.
- Streb P., Josse E.-M., Gallouët E., Baptist F., Kuntz M., Cornic G. (2005) Evidence for alternative electron sinks to photosynthetic carbon assimilation in the high mountain plant species *Ranunculus glacialis*. *Plant Cell and Environment* **28**, 1123-1135.
- Streb P., Shang W., Feierabend J. (1999) Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress. *Plant Cell and Environment* **22**, 1211-1223.
- Streb P., Shang W., Feierabend J., Bligny R. (1998) Divergent strategies of photoprotection in high-mountain plants. *Planta* **207**, 313-324.
- Sun X., Wen T. (2011) Physiological roles of plastid terminal oxidase in plant stress responses. *Journal of Bioscience* **36**, 1-6.
- Suzuki N., Mittler R. (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* **126**, 45-51.
- Trebst A. (1980) Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods in Enzymology* **69**, 675-715.
- Urbach W., Rupp W., Sturm H. (1983) *Praktikum zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. Thieme Stuttgart, New-York
- Valentini R., Epron D., De Angelis P., Matteucci G., Dreyer E. (1995) In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell and Environment* **18**, 631-640.
- Walters R.G. (2005) Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany* **56**, 435-447.
- Wiese C., Shi L.B., Heber U. (1998) Oxygen reduction in the Mehler reaction is insufficient to protect photosystem I and II of leaves against photoinactivation.

Physiologia Plantarum **102**, 437-446.

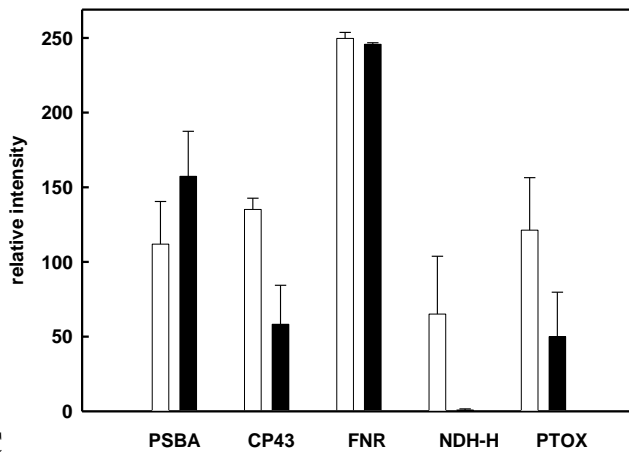
Yan J., Kurisu G., Cramer W.A. (2006) Intraprotein transfer of the quinone analogue inhibitor 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone in the cytochrome b6/f complex. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**, 69-74.



A

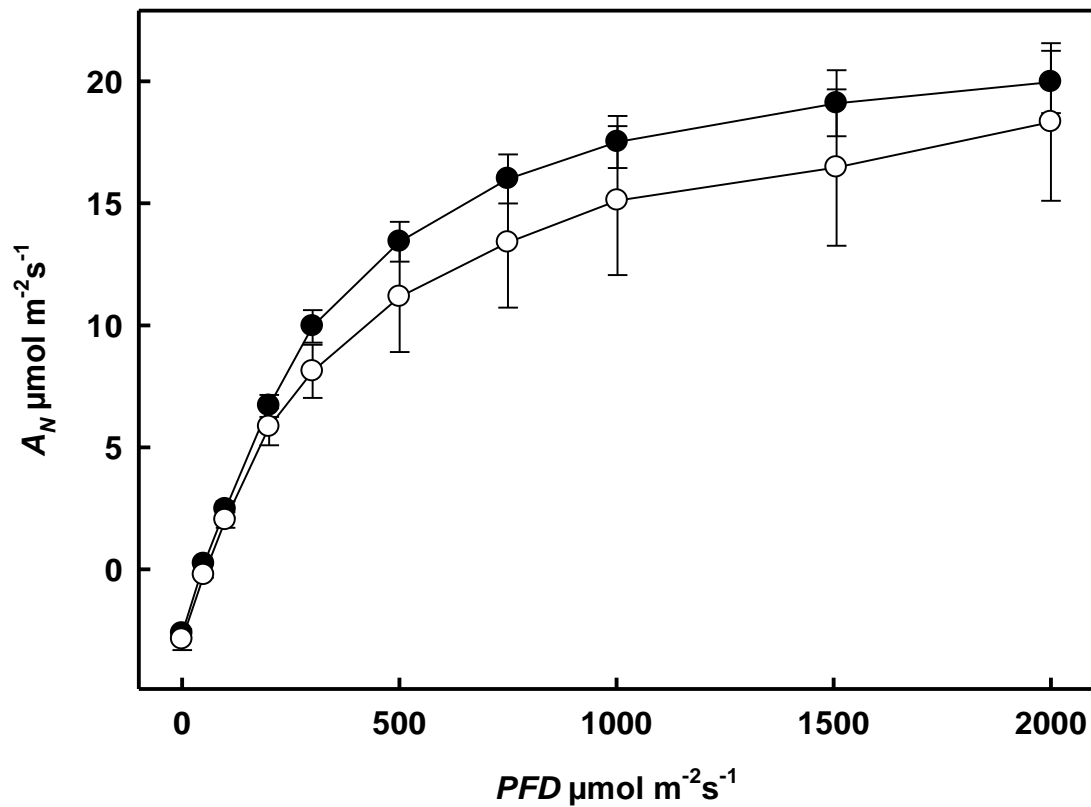


B

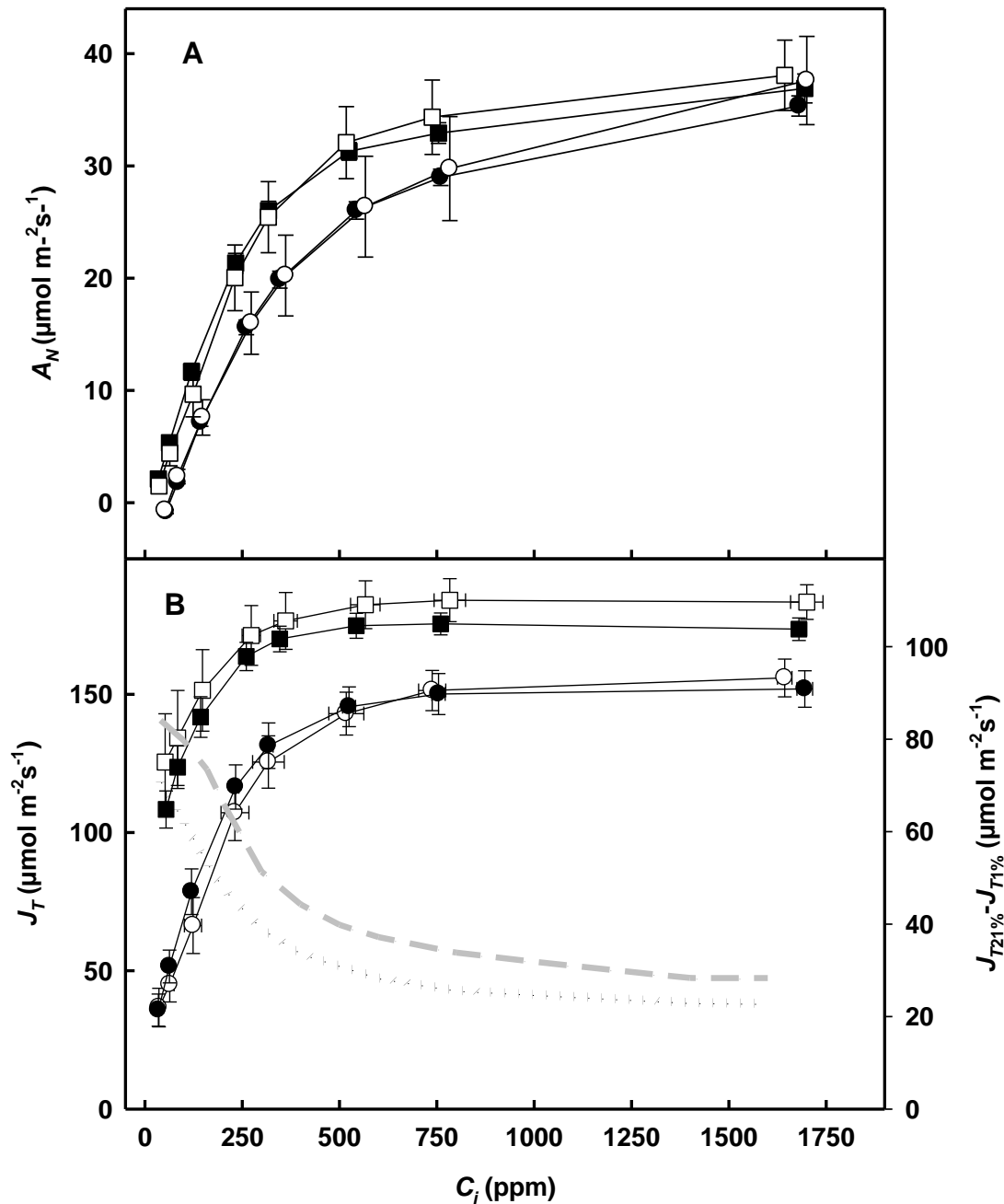


C

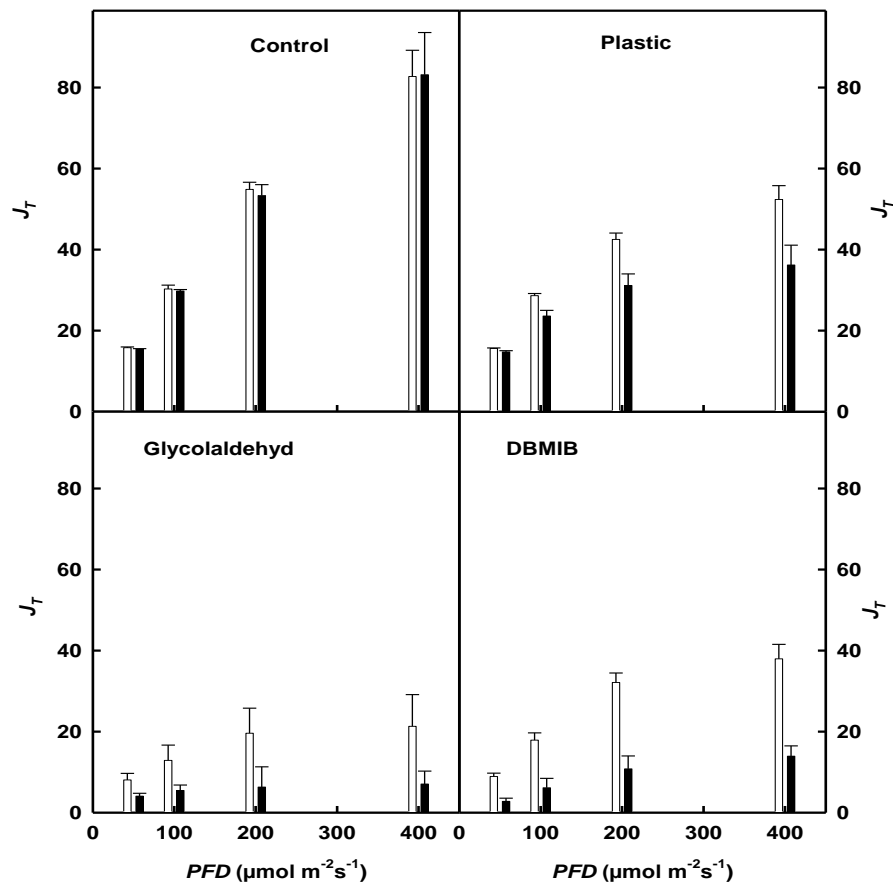
(Fig.1) Immunoblot of PTOX in crude extracts of *R. glacialis* leaves grown in the shade or full sunlight (sun) at 2400m altitude or in a growing chamber at low altitude at $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PFD and 6°C (GChamb). The position of the proteins was verified by protein markers. (A) The same amount of membrane protein was loaded into every slot. The result of one extraction is shown, which was loaded three times into separate slots (high altitude plants). (B) Independent immunoblot of PTOX, FNR, PSAB, CP43 and NDH-H. All immunodetections were done from the same set of extractions. The experiment was repeated independently twice in shade- and three time in sun-leaves with similar results and a representative blot is shown. (C) Mean values of the relative intensity of the immuno signal from two independent samples (shade-leaves, except for PTOX - three independent samples) and three independent samples (sun-leaves) and the standard error. The relative intensity was estimated from a digital image calculating the signal intensity from the same area with ImageJ free software.



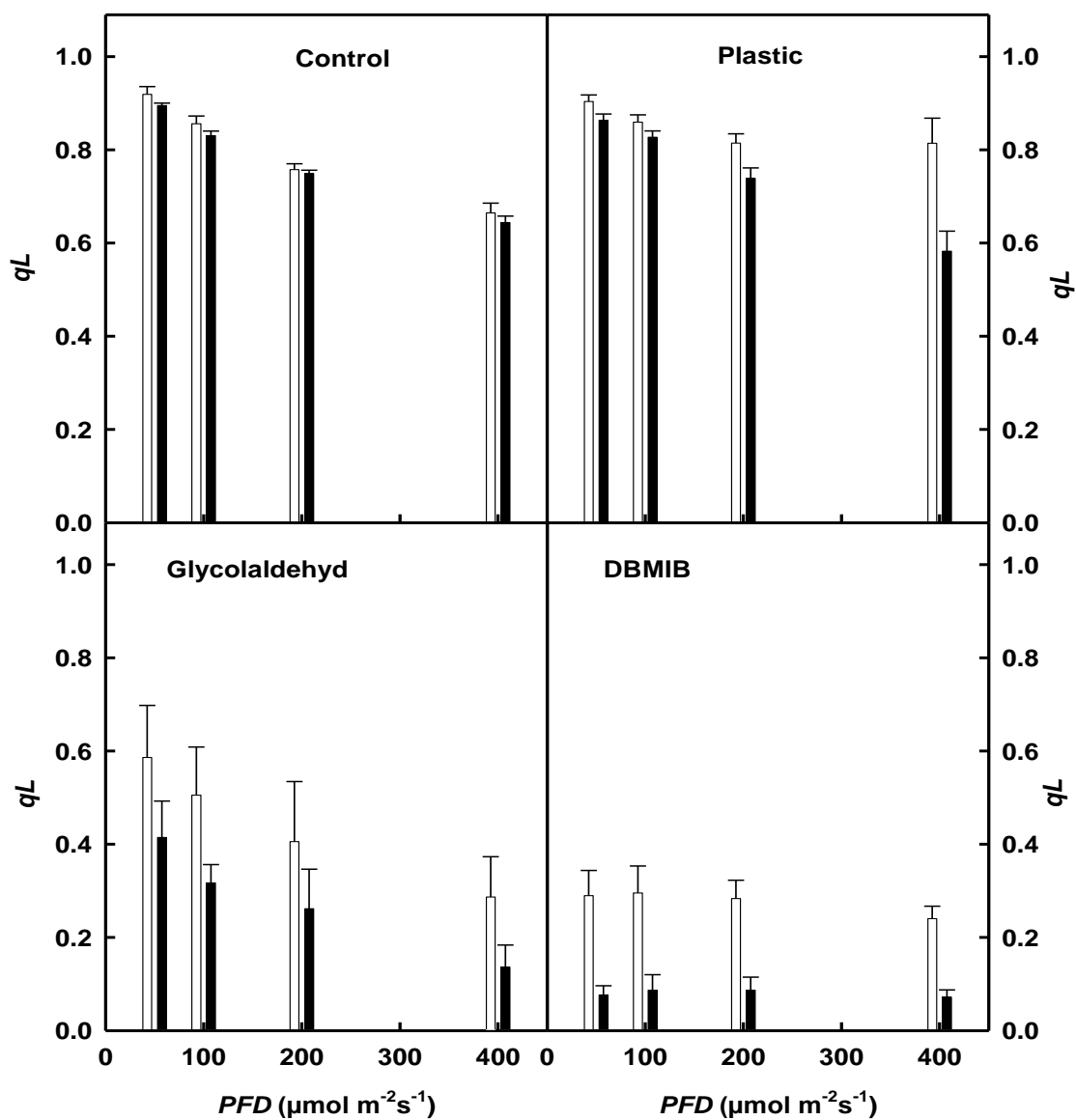
(Fig.2) Light response curve of photosynthetic net carbon assimilation (A_N/PFD) in *R. glacialis* shade- (black symbols) and sun-leaves (white symbols) collected at 2400 m altitude at 380 ppm C_a and 21 % oxygen. The leaf temperature was maintained between 22 and 23 °C. Mean values of at least 3 independent experiments and standard errors are shown.



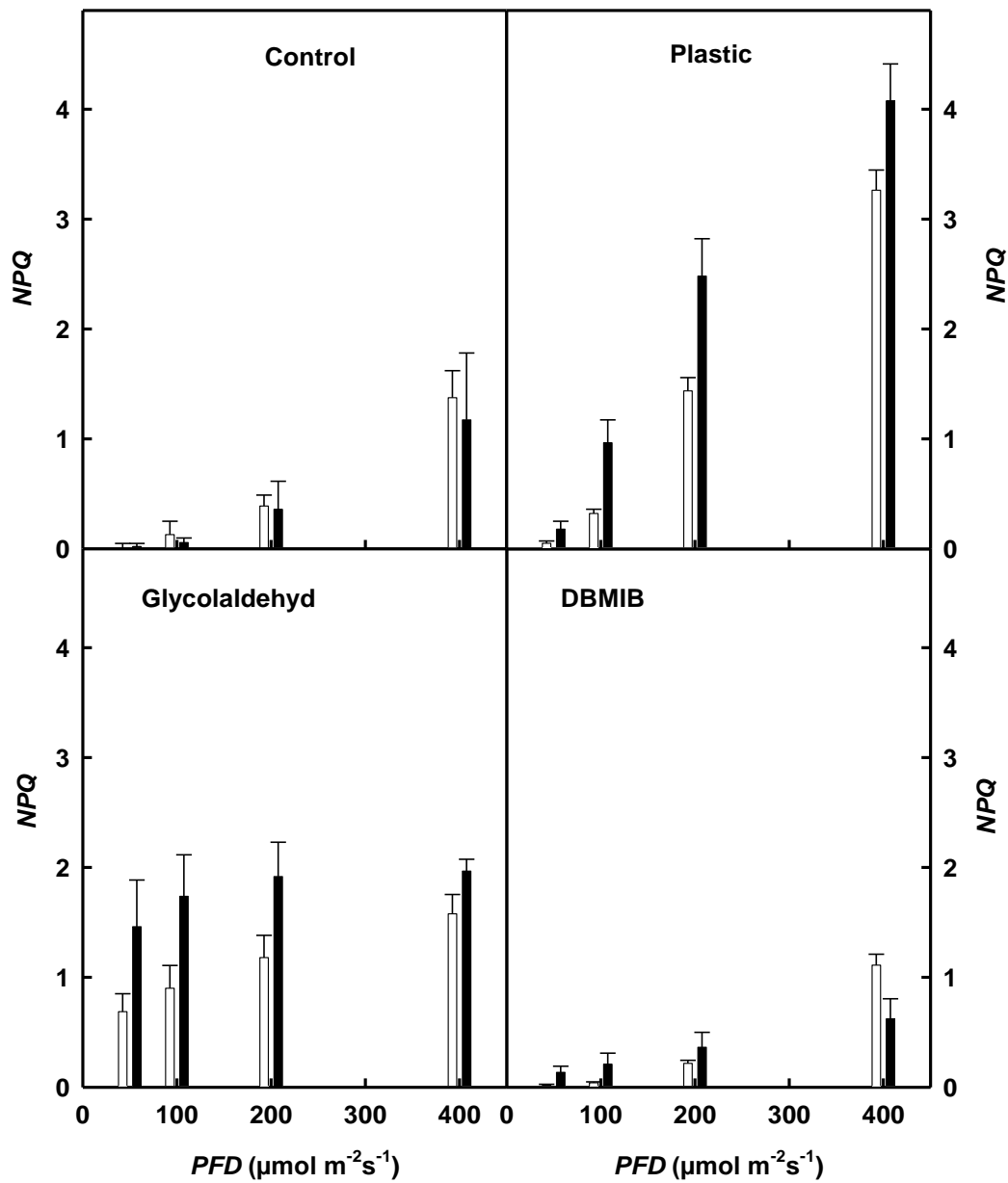
(Fig.3) (A) Net carbon assimilation (A_N) and (B) total electron flux (J_T) in 21% (circles) and 1% (squares) oxygen and the difference of total electron flux between 21% oxygen and total electron flux in 1% oxygen ($J_{T21\%}-J_{T1\%}$) as a function of internal CO₂ partial pressure (C_i) in shade- (black symbols and black dotted line) and sun- (white symbols and grey dashed line) leaves of *R. glacialis* collected at 2400 m altitude. The leaf temperature was maintained between 22 and 23 °C. Mean values of at least 3 independent experiments and standard errors are shown.



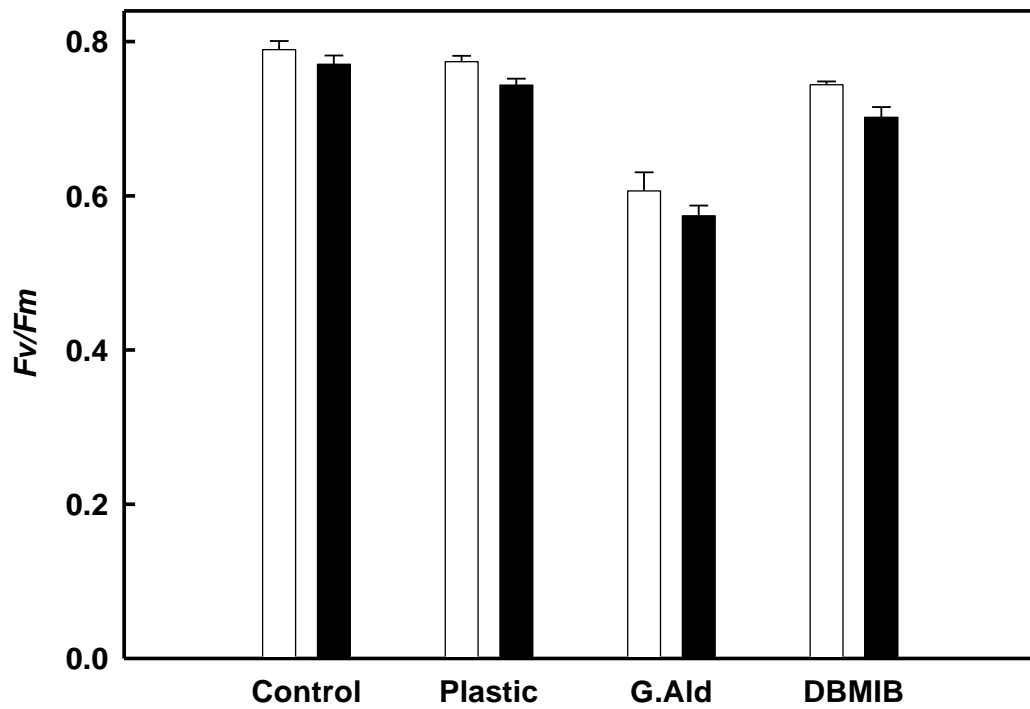
(Fig.4) Total electron flux (J_T) calculated from fluorescence measurements in detached shade- (black) and sun- (white) leaves of *R. glacialis* collected at 2400 m altitude. The oxygen evolution at saturating CO_2 was measured before the experiment to verify leaf intactness. Leaves were then kept 30 min in darkness and shortly illuminated with far-red light. Afterwards dark F_o and F_m were determined. Leaves were then illuminated with increasing PPFD for 30 min at each PPFD, while giving a saturating flash every 5 min. After the last flash, light was switched off and leaves were illuminated with far-red light to determine F_o' . The temperature of the leaf clip, housing the leaf, was maintained at around 25 °C during the whole experiment. Control leaves were kept on wet filter paper. “Plastic leaves” were enclosed in air-tight plastic bags before the fluorescence measurements. Leaves treated with 100 mM glycolaldehyde or 30 mM DBMIB were vacuum-infiltrated for 1 min and further left for 10 min in the inhibitor solution and subsequently transferred to wet filter-paper. Successful inhibitor uptake was verified after the fluorescence measurement with an oxygen electrode at saturating CO_2 . In all cases net oxygen evolution was zero. The Φ_{PSII} was sufficiently high even in the presence of DBMIB to calculate significant values of J_T . The mean values of at least four independent experiments and the standard errors are shown.



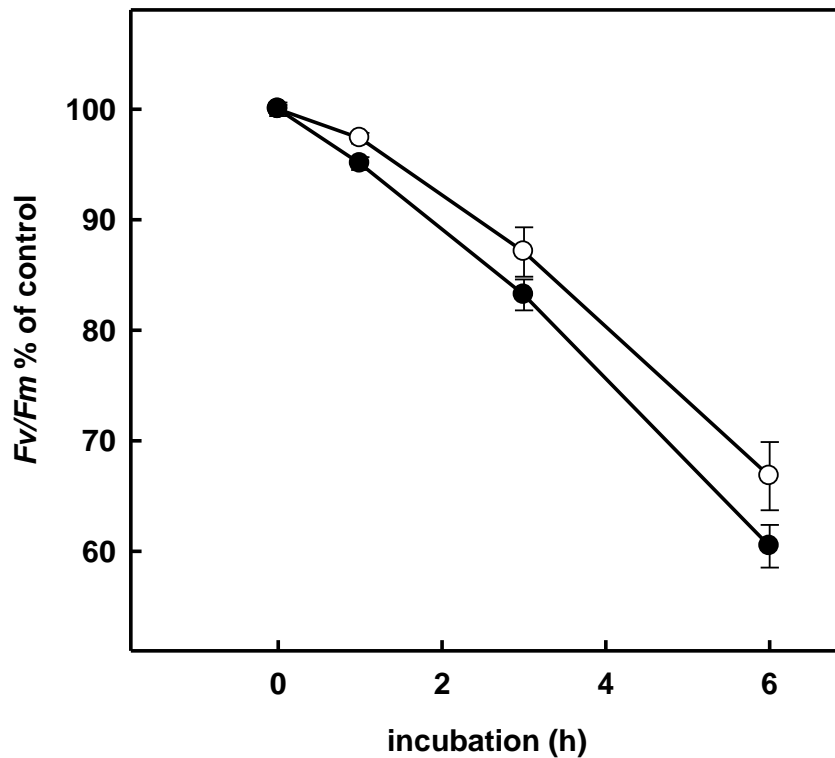
(Fig.5) Photochemical fluorescence quenching (q_L) calculated from fluorescence measurements in detached shade- (black) and sun- (white) leaves of *R. glacialis* collected at 2400 m altitude. Conditions were exactly the same as described in Fig. 4



(Fig.6) Non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) calculated from fluorescence measurements in detached shade- (black) and sun- (white) leaves of *R. glacialis* collected at 2400 m altitude. Conditions were exactly the same as described in Fig. 4



(Fig.7) F_v/F_m ratios of dark adapted detached shade- (black) and sun- (white) leaves of *R. glacialis* collected at 2400 m altitude after the measurement described in Fig. 4. After shutting of actinic illumination, leaves were acclimated for 30 min in darkness.



(Fig.8) Photoinhibition of PSII as measured by the F_v/F_m ratio in dark adapted detached shade- (black) and sun- (white) leaves of *R. glacialis* collected at 2400 m altitude in the presence of lincomycin. Leaves were incubated for 1 h in darkness in small petri-dishes in the presence of 3 mM lincomycin. Subsequently, leaves were illuminated shortly with far-red light and F_v/F_m at the beginning of the light exposure was measured. Afterwards leaves were illuminated with $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PFD at 25 °C. After 1, 3 and 6 h samples were taken, dark adapted for 30 min, shortly illuminated with far red light and F_v/F_m ratios were determined. The results present means of at least 4 independent experiments with standard errors.

	Day T	Night T	Day T	Day T	Night T	Day PFD	PFD
	mean	mean	max	min	min	mean	max
Shade-leaves	18.1 °C	9.3 °C	26 °C	6 °C	3.2 °C	649	1783
						$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Sun-leaves	19.0 °C	9.1 °C	33 °C	4 °C	2.2 °C	1231	2862
						$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

(Table 1) Light and temperature at the natural growing site of R. glacialis at the leaf level during the first week after leaf expansion of shade- and sun-leaves. Mean, maximum (max) and minimum (min) leaf day (8h - 18h) and night (18h - 8h) temperatures (T) and PFDs during this period are shown.

	Sun-leaves	Shade-leaves	% Difference
DW/area g/m²	28.9±1.9 ^a	26.8±2.5 ^a	-7%
Protein mg/m²	5166±386 ^a	3748±557 ^b	-28%
Chl a+b mg/m²	385±37 ^a	336±20 ^a	-13%
Chl a/b	3.4±0.08 ^a	3.1±0.1 ^a	-9%
Chl/carotenoid	5.2±0.2 ^a	5.2±0.3 ^a	0%
Cat mkat m⁻²	19.5±2.9 ^a	13.5±1.8 ^a	-31%
APX μkat m⁻²	54.3±9.0 ^a	36.4±3.6 ^a	-33%
G.O. μkat m⁻²	8.7±1.0 ^a	7.9±1.3 ^a	-10%
Total ascorbate mmol m⁻²	6.7±0.7 ^a	10.8±1.9 ^b	+61%
A_N max μmol m⁻²s⁻¹	58.1±0.2 ^a	40.4±1.6 ^b	-31%
J_T max μmol m⁻²s⁻¹	257±5 ^a	182±29 ^a	-29%
R_d μmol m⁻²s⁻¹	-2.9±0.4 ^a	-2.6±0.2 ^a	-11%

(Table 2) Characteristics of shade- and sun-leaves and their relative difference. Dry weight (DW) per leaf area, total soluble protein content, chlorophyll (Chl) a + b content and a/b ratio, chlorophyll/carotenoid ratio, catalase (Cat) activity, ascorbate peroxidase (APX) activity, glycolate oxidase (G.O.) activity, total ascorbate content and maximum net carbon assimilation (A_N) and maximum total electron flux at PSII (J_T) at 2000 ppm C_a , 2000 μ mol m⁻²s⁻¹ PFD and 21 % oxygen and dark respiration (R_d). All experiments were independently repeated for at least 3 times. Statistical significant differences at the $P < 0.1$ level are indicated by different letters.

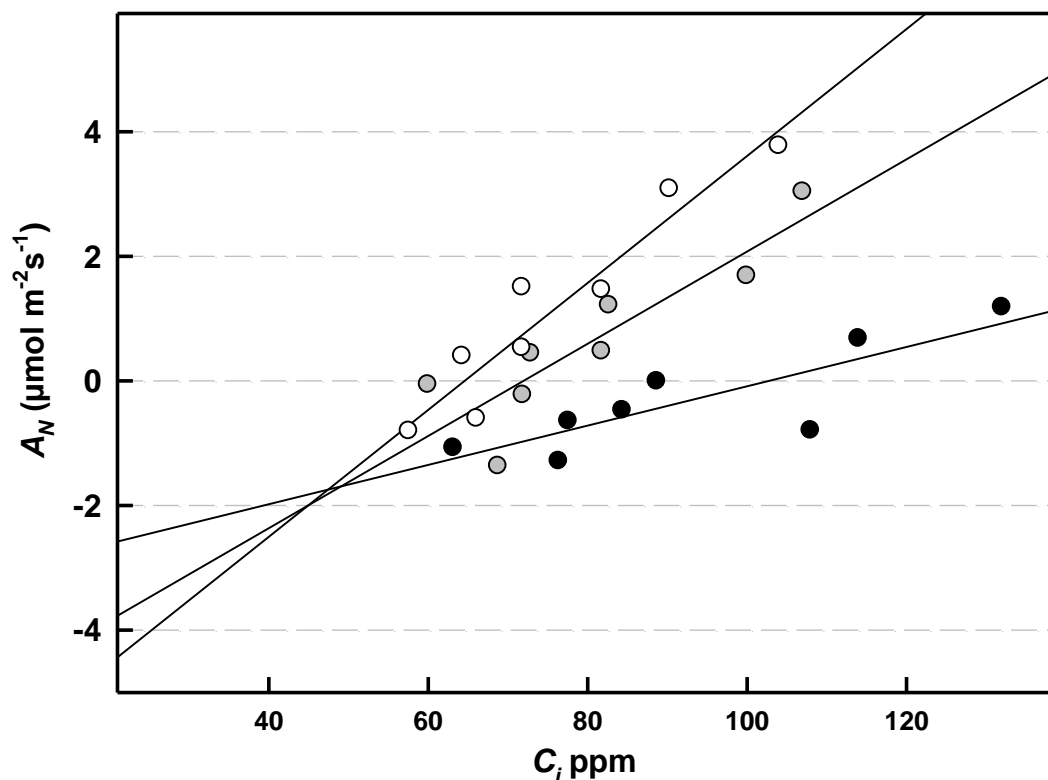
	Sun-leaves	Shade-leaves	Condition
$J_{T21\%-1\%max}$	84 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	71 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	C_a : 50 ppm, PFD : 750 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
$J_{T21\%-1\%min}$ = alternative e-flow	28 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	23 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	C_a : 2000 ppm, PFD : 750 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Difference (PRcap)	56 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	48 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	
e-consumption	52.0±5.8 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	47.6±7.6 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	
G.O.	1	1	

(Table 3) Data used for estimating the photorespiration capacity (PRcap) and alternative electron flux in *R. glacialis* shade- and sun-leaves. The data were taken from J_T/C_i (Figs 3B) response curves and from Table 2. $J_{T21\%-1\%max}$ and $J_{T21\%-1\%min}$ were taken from Fig. 3 at maximum and minimum difference of total electron flux in 21 % oxygen and 1% oxygen under low and high C_i . The difference between the two measurements was taken as PRcap. Glycolate oxidase (G.O.) activity from Table 2 was suggested to catalyse a photorespiratory reaction which consumed maximal 6 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons for every $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ glycolate oxidised (Streb et al. 2005). All unities for electron transport are given as $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons.

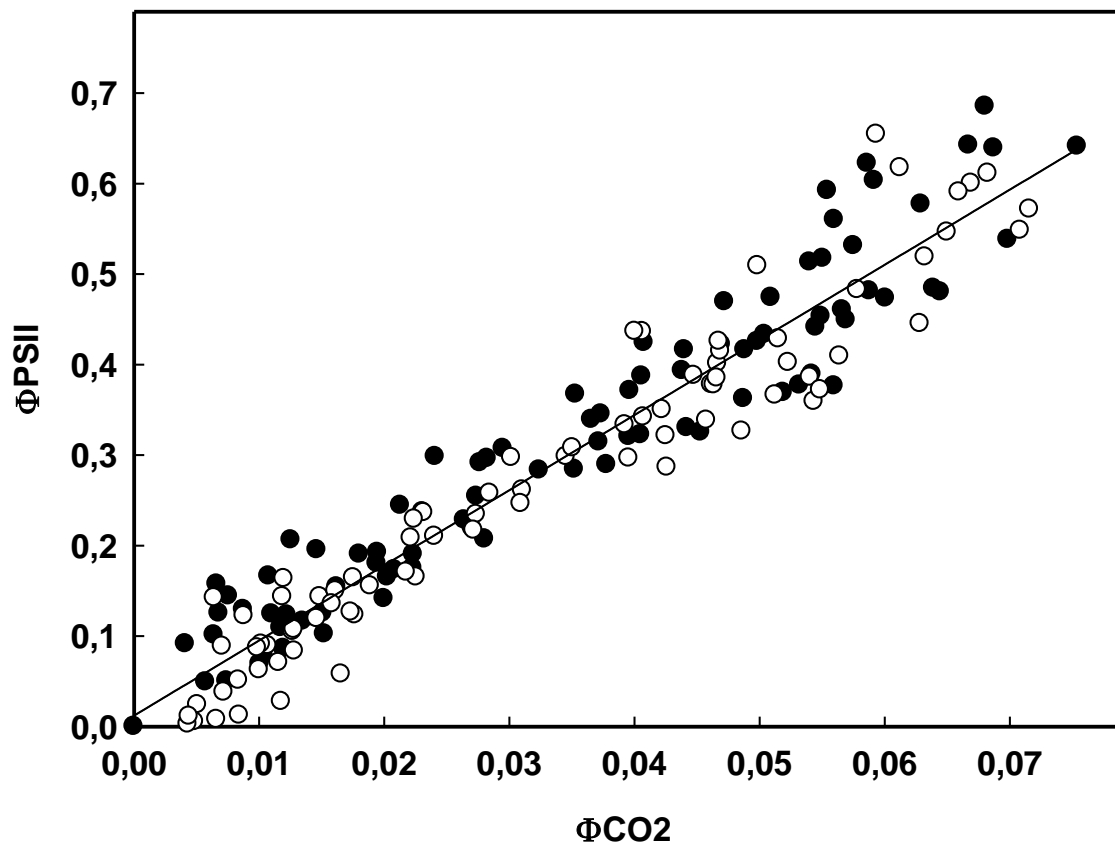
	Sun-leaves	Shade-leaves
<i>J_T max</i> (Table2)	257±5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	182±29 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
<i>PRcap</i> (Table3)	22%	26%
PTOX capacity (DBMIB)	15%	8%

(Table 4) Relative contribution of photorespiration and PTOX activity to electron consumption in sun- and shade-leaves of *R. glacialis*. Data were taken from Table 2 and 3 and Fig. 4. The photorespiratory electron consumption capacity *PRcap* and the PTOX activity as measured from *J_T* in the presence of DBMIB at 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PFD were related to the maximum *J_T* measured at 21% oxygen, 2000 ppm *C_a* and 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PFD.

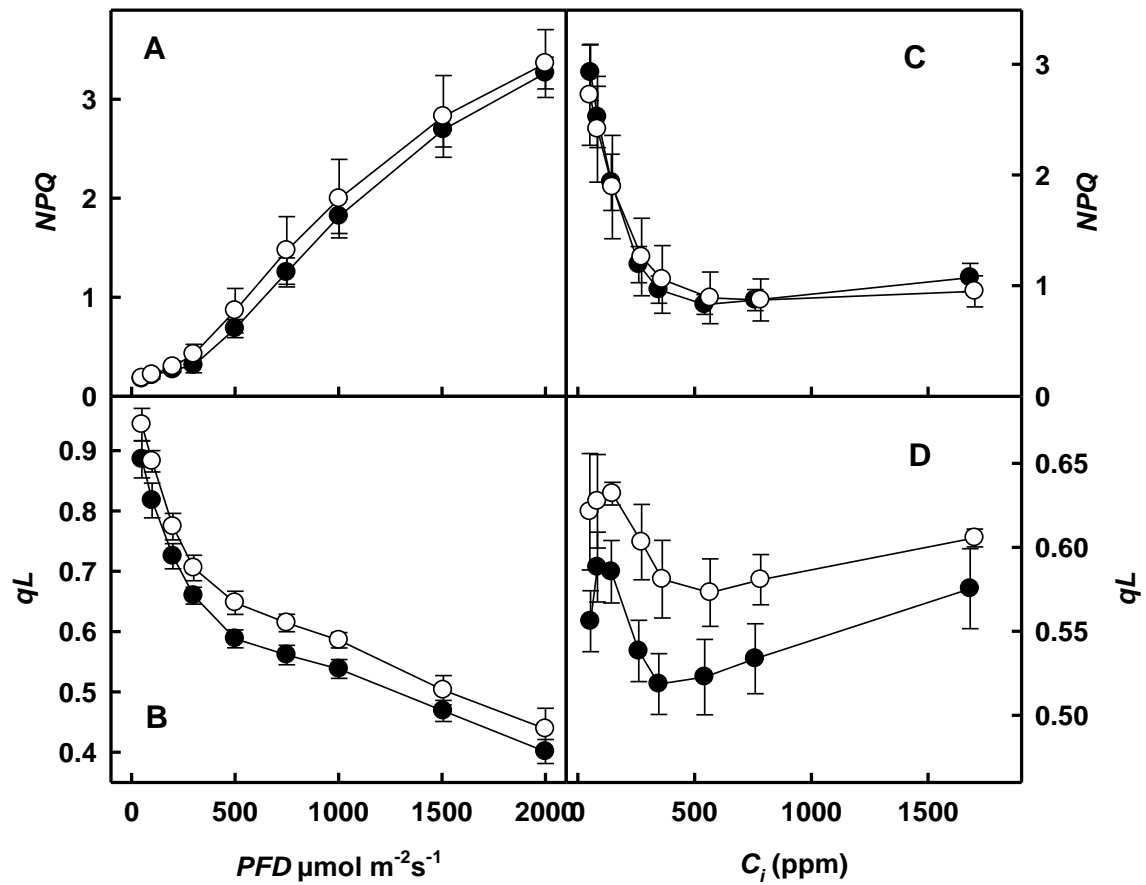
Supporting information:



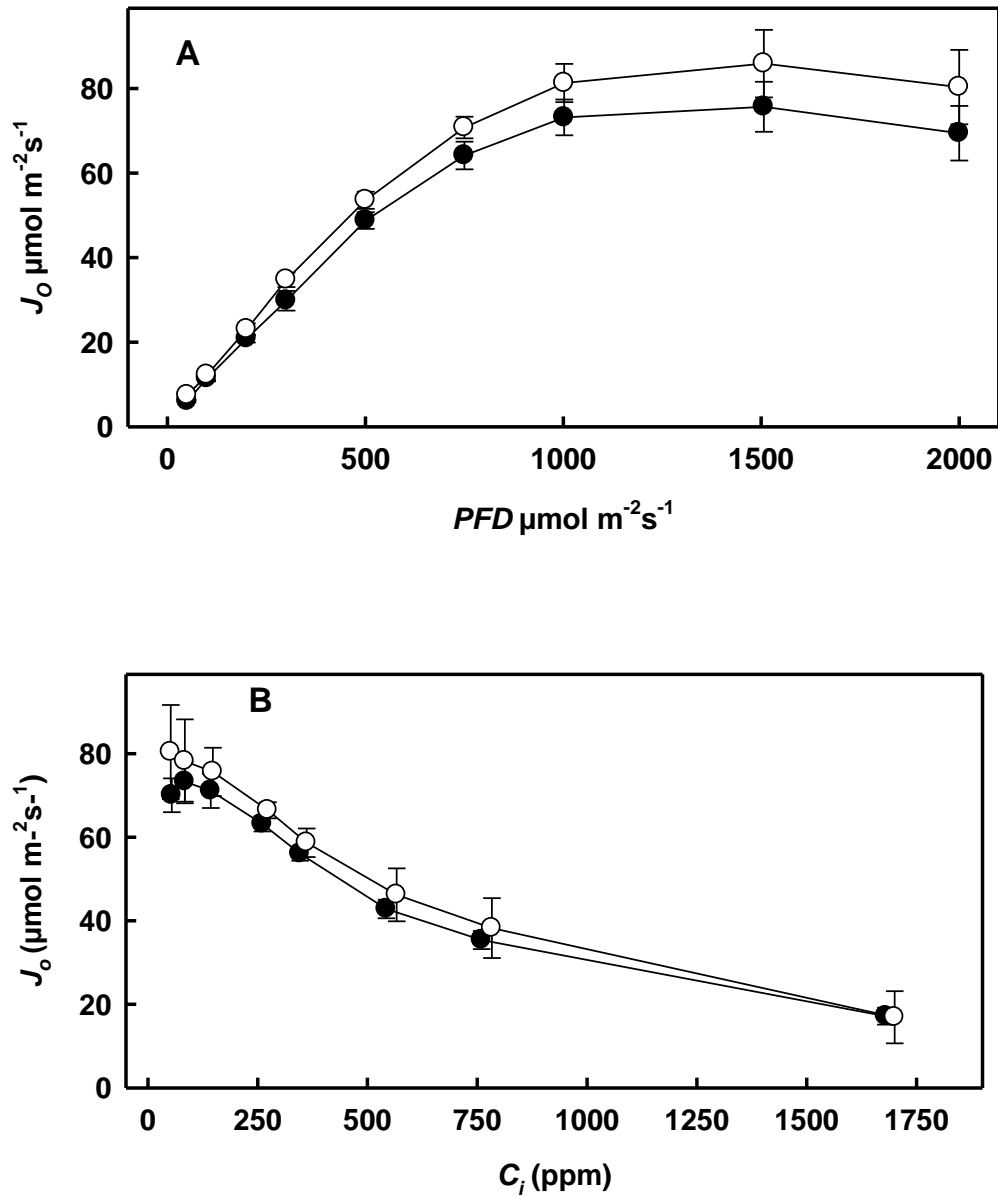
(Fig.S1) Estimation of light respiration (R_L) according to Laisk (1977). A_N/C_i response curves at low C_i partial pressure were measured at three different PFDs: $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (black), $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (grey) and $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (white). The intersection of the regression line of the three response curves is taken as R_L . The experiment was repeated with sun- and shade-leaves and for all measurements a mean R_L of 66 % of R_d was determined. A representative estimation of sun-leaves is shown.



(Fig. S2) Relationship between quantum yield of CO_2 assimilation (Φ_{CO_2}) and quantum yield of PSII (Φ_{PSII}) in an atmosphere of 1 % oxygen in shade- (black symbols) and sun- (white symbols) leaves of *R. glacialis* collected at 2400 m altitude. Data from light and C_i response curves were taken. The regression line was: $\Phi_{PSII} = 8.303 \Phi_{CO_2} + 0.012$ $r^2 = 1$



(Fig.S3) Light (A,B) and C_i (C,D) response curves of NPQ (A, C) and qL (B, D) in *R. glacialis* shade- (black symbols) and sun-leaves (white symbols) collected at 2400 m altitude measured in an atmosphere of 21 % oxygen and at a leaf temperature of 22 - 23 °C. The atmospheric CO₂ partial pressure was 380 ppm for the light response curve and the PFD was 750 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for the C_i response curve. Mean values of at least three independent measurements with standard errors are shown.



(Fig.S4) Light response curve at 380 ppm C_a (A) and CO_2 response curve at $750 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD of electron flux to oxygen (J_O) as calculated according to Valentini et al. (1995) in *R. glacialis* shade- (black symbols) and sun-leaves (white symbols) collected at 2400 m. The leaf temperature was maintained between 22 and 23 °C. Mean values of at least three independent measurements with standard errors are shown.

General discussion

***Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*: two different models of physiological acclimation to extreme environments**

The alpine environment at high altitude challenges survival for most of higher plants due to unfavorable living conditions. Consequently very few species can survive at high altitude. Acclimation mechanisms in these scarce species allow studying the flexibility of plant physiological acclimation responses to abiotic constraints. Such extreme conditions are demonstrated by large temperature variations during the same day, as well as combination of high light and extremely low or high temperatures and very high photon flux densities at elevations above 2400 meters (Körner 2003, Laureau et al. 2011, Larcher et al. 2010, Streb & Cornic 2012).

Soldanella alpina and *Ranunculus glacialis* are two species who do not show typical morphological adaptation to this environment. The occurrence of *Soldanella alpina* is often restricted to snow beds and this species keeps leaves green throughout the winter for up to three years (Streb et al. unpublished). When snow melts at the end of spring, green leaves are still covered by snow at temperatures around the water-freezing point and may be exposed to very high light intensities during the same time (Streb & Cornic 2012). After snowmelt, leaf temperatures may, however, rise markedly and during summer leaf temperatures may increase to more than 40°C (Laureau et al. 2011). *Ranunculus glacialis* was found up to 4275 meters elevation and is known to be one of the higher plant species in the Alps which survive at highest altitudes (Zimmermann 1975). This species is generally not found at altitudes lower than 2400 meters in the European Alps. This is probably a consequence of its high sensitivity to elevated temperatures (Streb et al. 2003). Consequently, at the lower altitude of its distribution in the Alps *Ranunculus glacialis* is only found in trickles coming from snow melt, in which water is extremely cold, but it is abundant at higher altitudes.

These two species can be supposed to have efficient CO₂ assimilation under varying extreme climatic conditions because short growing seasons strongly limits the time schedule to finish their life cycle. For example, it is known that thirty days of CO₂ assimilation are necessary for *Ranunculus glacialis* to amortize the energetic investment for leaf implementation (Diemer and Körner 1996).

In these two species the importance of antioxidative protection and the role of PTOX for maintaining photosynthetic activity were investigated.

Previous investigations suggested that the role of antioxidative protection is very different in *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* leaves. While all measured components of antioxidative protection were high in *Soldanella alpina*, they were weak in *Ranunculus glacialis* (Streb et al. 1997, 1998, Wildi & Lütz 1996). In accordance, *Soldanella alpina* was very tolerant to oxidative stress induced by methylviologen, while *Ranunculus glacialis* was very sensitive (Streb et al. 1998). The successful 50% artificial decline of glutathione contents by buthionine-sulfoximine (BSO) was therefore thought to impair antioxidative protection. Surprisingly, photoinhibition of PSII and of catalase as well as parameters of oxidative damage were identically affected by light in leaves with low and normal glutathione content in *Soldanella alpina* as well as in *Ranunculus glacialis*. This result was consistently observed under ambient and low temperature and furthermore, also in the presence of methylviologen (Laureau et al. 2011) and contrast numerous reports indicating a participation of glutathione in chilling and oxidative stress tolerance in particular in chilling sensitive plant species (Foyer & Noctor 2011, Foyer & Shigeoka 2011, Gomez et al. 2004, Kocsy et al. 2000a, 2000b, 2001, May et al. 1998, Meyer 2008, Rouhier et al. 2008). However, in chilling resistant species, like *Secale cereale*, glutathione depletion had only minor effects (Streb & Feierabend 1999) like here observed in the two alpine species. Nevertheless, other antioxidative protection mechanisms were impaired in leaves with low glutathione content as observed by an alleviation of high-light-induced increase of ascorbate in *Soldanella alpina* and by the impairment of catalase-activity-increase in *Ranunculus glacialis* at low temperature.

In conclusion, tolerance to low-temperature-induced photoinhibition does not depend on high glutathione contents and the increase of alternative antioxidative protection in both alpine species. Similarly, the leaf-freezing temperature was not influenced by high or low glutathione contents in both species, contrary to reports where high glutathione contents participate in freezing tolerance (Guy 1990, Kocsy et al. 2000a, Polle et al. 1996, Zhao and Blumwald 1998). Overall, a survey of antioxidative protection in chilling sensitive and chilling resistant plants (Fortunato et al. 2010, Hodges et al. 1996, Streb & Cornic 2012, Stevens et al. 2008) suggests that antioxidative protection participates mainly in chilling and light tolerance only in sensitive plants but less or not at all in resistant plant species (Streb & Feierabend 1999, Laureau et al. 2011), who have obviously developed

other modes of protection. However, it should be noted that not all antioxidative scavenging systems were investigated by Laureau et al. (2011), opening the possibility that glutathione depletion was compensated by e.g. peroxiredoxins, tocopherol or carotenoids (Dietz 2003, Havaux 1998, Havaux et al. 1998, Triantaphylidès & Havaux 2005, Munne Bosch & Alegre 2002, Smirnoff 1998, Smirnoff 2000).

However, lowered glutathione content impaired photoinhibition tolerance at high temperature in both species, in particular the recovery from high-temperature-induced PSII inactivation (Laureau et al. 2011). In accordance with suggestions of Takahashi & Badger (2011), oxidative stress may impair primarily the repair of damaged PSII. In this case higher glutathione contents may confer improved protection. At low temperature other mechanisms must be active to prevent photoinactivation in both alpine species. However, the function of a very high antioxidative protection capacity in *Soldanella alpina* leaves remains still to be investigated.

In comparative experiments with *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* leaves, high PTOX contents in both species were measured (Laureau et al. 2011). Since PTOX activity was already suggested to act as alternative electron acceptor in leaves of *Ranunculus glacialis*, and since *Ranunculus glacialis* leaves contain the highest PTOX contents so far observed in comparative experiments (Streb et al. 2005), it was suggested that PTOX could function as the security valve to protect leaves from photoinhibitory damage under alpine conditions. The choice of *Ranunculus glacialis* for this investigation was strengthened by observations that electron flux at PSII is much higher than in *S. alpina* and non-radiative energy dissipation much lower under comparable conditions (Streb et al. 1998).

However, thylacoid membranes of tobacco plants overexpressing the *Arabidopsis thaliana* PTOX (At-PTOX) gene produce higher amounts of reactive oxygen and plants were more susceptible to photoinhibition than the WT in high light (Heyno et al. 2009). If PTOX activity enhances reactive oxygen formation, tolerance would necessitate enhanced antioxidative protection. This does not correlate to results shown by Laureau et al. (2011) with glutathione deficient leaves, if PTOX activity acts as a security valve in *Ranunculus glacialis*. The tobacco PTOX⁺ plants were therefore reinvestigated for their CO₂ assimilation activity under different light conditions and at different CO₂ partial pressures. As shown previously by others (Joet et al. 2002, Heyno et al. 2009), and also in

these experiments an enhanced electron flux attributable to PTOX in At-PTOX+ compared to Wt plants was observed, suggesting that PTOX was active. Surprisingly, carbon assimilation was not diminished in PTOX+ plants but markedly enhanced compared to the WT (Chapter 4, Fig.1) suggesting that PTOX ameliorates carbon assimilation in PTOX+ plants. The contradictory results to Heyno et al (2009) cannot be unequivocally explained at present and may depend on growing conditions of the plants.

In PTOX+ tobacco leaves, SOD contents were insufficient to compensate for PTOX-induced superoxide formation under high light. Since SOD activity was not investigated in chapter 4, higher SOD activities might be induced by our growth conditions as compared to those of Heyno et al. (2009). Alternatively, the PTOX protein in PTOX overexpressing plants investigated by Heyno et al. (2009) might be incorrectly assembled, or not well integrated into the thylakoid membrane, thus preferentially forming superoxide instead of water. Similarly, other attempts to demonstrate PTOX activity in transgenic plants were not successful (Rosso et al. 2006, Okegawa et al. 2010). However, contrary to these results obtained from Arabidopsis, PTOX+ tobacco plants showed enhanced alternative electron flux to PTOX, as measured by different approaches (Joet et al. 2002, Heyno et al. 2009, Chapter 4, Table 1.).

Our growing conditions differed from those of Heyno et al. (2009) by occasionally high supplemented illumination with sunlight (Chapter 4). One might suggest that this supplemental irradiation is necessary to initiate the correct assembly of the PTOX protein or to support PTOX with essential cofactors.

At least, it is also possible that PTOX produces superoxide as a side reaction of plastoquinol oxidation. Its activity would be necessitating a coupling protein to ensure that the second quinol is already bound before oxygen binding, thus avoiding this superoxide generation, like in other diiron carboxylate protein (Berthold et al. 2000). Nevertheless under high light conditions, enhanced PTOX contents were observed in several different plants species and as a consequence of acclimation to cold, heat, salt and high light stress (Busch et al. 2008, Díaz et al. 2007, Gamboa et al. 2009, Ibáñez et al. 2010, Kong et al. 2003, Li et al. 2008, 2010, Moseley et al. 2006, Quiles 2006, Savitch et al. 2010, Shahbazi et al. 2007, Simkin et al. 2008, Stepien and Johnson 2009, Streb et al. 2005, Tallón & Quiles 2007, Wang et al. 2009). Clearly, more work is needed to understand the correct assembly and function of PTOX in transgenic plants.

Plastid terminal oxidase is induced by high light in *Ranunculus glacialis* leaves and is involved in protection against photoinhibition

Therefore PTOX content and activity was further investigated in *Ranunculus glacialis*, the plant species with the highest reported PTOX content (Streb et al. 2005). Environmental conditions of *Ranunculus glacialis* were changed in order to find conditions which diminish the PTOX content in mature leaves. According to previous investigations, growth at low elevation and elevated temperature is successful to decline PTOX contents in *R. glacialis* and to increase the susceptibility to photoinhibition (Streb et al. 2003a, 2005). However, plants grown at elevated temperature are not viable and therefore plants were grown at low light and low temperature. Under this condition, PTOX content was nearly absent in *Ranunculus glacialis* leaves (Laureau et al. submitted). However, irregular growth of plants and fragile leaves impaired the detailed characterization of these plants. Preliminary experiment suggests, however, that PTOX content in these plants can be increased by transfer to high light.

For this reason, less severe changes of environmental conditions could provide healthy *Ranunculus glacialis* plants. Therefore *Ranunculus glacialis* plants were investigated at different altitudes to modify the growth temperature, or shaded to modify the incident photon flux density. We showed that high PTOX contents in *Ranunculus glacialis* was induced only by high light exposure and not by low growing temperatures (Laureau et al. submitted). Preliminary experiments suggest that high PTOX contents were not modulated by variations of altitude with different mean temperatures but also different photon-flux density. In these experiments mean photon flux density was highest at low altitude but high photon flux density extremes were higher at high altitude (Chapter 4). Therefore, short extreme high photon flux densities might modulate PTOX content in the same way as high mean photon flux density.. Therefore, detailed characterization of leaves was only performed in shaded and sun-leaves from the same altitude with similar leaf-temperatures during development (Laureau et al. submitted).

Since leaves with high and low-PTOX content were obtained by growing plants in partial shade and full sunlight, these plants were investigated in detail for potential PTOX activity, indicated by alternative electron transport to PTOX. While some specific shade acclimation was apparent in shade- compared to sun-plants, photosynthetic carbon assimilation as a function of PFD and as a function of C_i was nearly identical in shade and

sun leaves (Laureau et al. submitted). In parallel to the PTOX content, also the content of the NDH protein was markedly higher in sun- than in shade leaves. Other photosynthetic protein contents differed less markedly in shade and sun leaves.

The main electron consuming reaction next to carbon assimilation in plants is photorespiration (Ort & Baker 2002). Therefore, the photorespiratory capacity to consume electrons in sun and shade leaves was estimated and found to differ only slightly in both leaf types ($48 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in shade leaves and $56 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in sun leaves). Under conditions of suppressed photorespiration (high C_i and 1 % oxygen) alternative electron flow was estimated to be slightly higher in sun leaves ($28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) than in shade leaves ($23 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Overall these results did not correlate to the high difference of the PTOX content between shade and sun plants, but confirmed that enhanced alternative electron transport occurs in high PTOX plants, as was also demonstrated in PTOX+ compared to WT tobacco (see above). Several explanations for the low difference of alternative electron transport in shade and sun-leaves are possible:

- 1) PTOX activity may not be saturated in sun-leaves and could be much higher if it would be possible to increase photon-flux densities further or if metabolism is impaired by additional stress, while in shade plants PTOX activity may already be at its maximum.
- 2) Alternative electron flow in shade plants is not entirely attributed to PTOX but also to alternative electron acceptors like the Mehler reaction or the malate valve.

The Mehler reaction was repeatedly supposed to consume large amounts of photosynthetically generated electrons (Asada 1999). This assumption was however, contradicted by results of Driever & Baker (2011) showing that electron flux to the Mehler reaction is negligible under atmospheric conditions and that low fluxes are only observed under CO_2 limitation. However, slightly higher rates of the Mehler reaction in shade- compared to sun-leaves were indicated by higher rates of photoinhibition in the presence of lincomycin. It remains however questionable, if significant electron fluxes to the Mehler reaction occurred under our experimental conditions, particularly regarding the high sensitivity of *Ranunculus glacialis* to methylviologen-induced superoxide formation (Streb et al. 1998).

The malate valve is induced under highly reducing conditions in the chloroplast (Scheibe et al 2005). Under natural high light conditions at the Galibier pass, the activity of NADPH malate deshydrogenase was shown to be $8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons (Streb et al. 2005). Measurements of qL, indicating reduction of the plastoquinone pool by low qL,

were only slightly lower in shade than in sun-leaves (Laureau et al. submitted) opening the possibility of slightly enhanced malate valve activity in shade-leaves. However, neither the malate valve nor the Mehler reaction can be supposed to explain an alternative electron flux of more than $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons. While some electrons might leak electron consumption by PTOX via the above discussed reactions, the high alternative electron consumption of sun- and shade-leaves under non-photorespiratory conditions can be explained by PTOX activity which may not reach maximum activity in sun leaves. It should be noted, that all experimental conditions in An –PFD and An-ci response curves could not limit the photosynthetic capacity of sun and shade leaves. If PTOX acts as security valve, one would suggest full activity only under conditions where other electron consuming pathways are saturated. In fact, preliminary measurement in an atmosphere containing 2000 ppm CO₂ allowed to obtain conditions were photosynthetic capacity of sun- and shade-leaves was approaching a limit and photorespiration is negligible. Sun-leaves showed a markedly higher An and Jt capacity than shade-leaves (Laureau et al. submitted). Experiments could only be repeated for two times, but they suggested a high increase of excess electron flow to oxygen. The calculation of $JT21\%IO_2 - JT1\%O_2$ at the highest PFD estimated up to $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in excess in shade-leaves and up to $57 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons in sun-leaves (data not shown). Suggesting that also other electron acceptors are saturated under this conditions the difference of $17 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ electrons corresponds roughly with the difference of Jt measured in the presence of DBMIB. Further investigations at low temperature or with closed stomata could limit carbon assimilation as well as photorespiration. It would be interesting to see whether higher electron fluxes attributed to PTOX occur under such conditions in high-PTOX plants while this electron flux could be markedly lower in low-PTOX plants.

Hence attempts were made to limit carbon assimilation and photorespiration with detached leaves. In this experimental system it was not possible to measure carbon assimilation and therefore conclusions were drawn from chlorophyll fluorescence measurements only. Carbon assimilation and photorespiration were successively limited by enclosing leaves into tight plastic bags and by depleting ribulose-bis-phosphate contents with glycolaldehyd (Wiese et al. 1998). In air-tight plastic bags, photorespiration is possible at the CO₂ compensation point. Under this condition, sun leaves showed higher rates of electron transport a higher qL but lower NPQ than shade leaves at higher PFD, suggesting enhanced consumption of electrons before the Mehler reaction or the

Malate valve. If the Mehler reaction and the malate valve would be involved in electron consumption, one would expect higher NPQ in sun leaves, due to higher electron transport rates and less chloroplastic ATP consumption. This would be particularly true, if cyclic electron flow around PSI would also be active and increases the proton gradient (Cornic et al. 2000). This result was confirmed in the presence of glycolaldehyde where also electron consumption by photorespiration was blocked. Also under this condition, q_L and electron flux were higher in sun than in shade leaves but NPQ remained lower. Electron consumption by PTOX can be assumed to generate a pH gradient due to proton liberation at the oxygen evolving complex. Electron transport to PSI and consumption by the Mehler reaction and the malate valve, however, generates a higher proton gradient because protons are also liberated by plastoquinone oxidation at cytochrome b6/f and a possible additional Q cycle (Cramer et al. 1996). Since neither the Mehler reaction, nor the malate valve consumes ATP, the proton gradient and the NPQ must be higher in this case which was apparently true in shade but not in sun leaves. A higher proportion of transported electrons were thus obviously consumed by PTOX in sun compared to shade leaves.

The final proof for enhanced PTOX activity in sun compared to shade leaves was, however, shown in the presence of DBMIB which blocks any electron transfer through the cytochrome b6/f complex (Trebst et al. 1974). In the presence of DBMIB, electron transfer was only possible to PTOX and since measurements of oxygen gas exchange indicated a net oxygen evolution of zero, any electron transport through PSII must reduce as much oxygen as is formed in water oxidation, excluding the activity of possible side reactions to form superoxide (Berthold et al. 2000). In the presence of DBMIB, electron flux through PSII was higher than in the presence of glycolaldehyde at higher PFD, suggesting that as long as electron transfer to PSI is allowed, maximum PTOX activity is suppressed. Since in the presence of glycolaldehyde photoinhibition was higher than in the presence of DBMIB (Laureau et al. submitted), superoxide formation by PTOX should not occur in *R. glacialis* as shown in tobacco (Heyno et al. 2009).

However, in the presence of DBMIB marked differences in electron transport to PTOX were visible in sun and shade plants suggesting a much higher capacity in sun leaves, in accordance with differences in PTOX contents (Laureau et al. submitted). Higher electron transport in DBMIB incubated sun leaves correlated in this case with a higher q_L and a higher NPQ in sun compared to shade leaves at the highest PFD applied. However, this result also suggests, that the affinity of PTOX for plastoquinone is rather low and high

electron fluxes to PTOX are only observed under conditions of a highly reduced plastoquinone pool, as induced by DBMIB (Joet et al. 2002) or in cytochrome b6f mutants (Houille-Vernes et al. 2011) but not under conditions where alternative electron consumption pathways are active or assimilation, photorespiration and NPQ are not saturated.

Environmental conditions in high alpine environments might occasionally limit assimilation, photorespiration and additional alternative pathways. Repeated measurements of combined leaf temperature and PFDs at the leaf level during the vegetation period of *Ranunculus glacialis* and *Soldanella alpina* leaves have shown single extreme climatic events (Laureau et al. 2011, Streb & Cornic 2012, Chapter 4), which can be supposed to induce excess photosynthetic electron transport and short periods of high plastoquinone reduction. Under such conditions, cyclic electron transport around PSI might aggravate the problem and high PTOX activity might protect these alpine species from harmful reactive oxygen formation.

Clearly, more work is needed to understand the security valve function of PTOX in alpine plants and how this function is induced under the given environmental alpine conditions. In *Ranunculus glacialis* leaves, high PTOX contents in mature leaves did not correlate to high carotenoid contents, suggesting that PTOX is not related to carotenoid synthesis in developing leaves (Laureau et al., submitted). To further characterize PTOX function, the second model plant, *Soldanella alpina*, could help to clarify the need of PTOX for carotenoid synthesis or as security valve. Since *Soldanella alpina* leaves keep their pigments for at least two subsequent vegetation periods, high PTOX contents would only be necessary in developing leaves if PTOX function is limited to carotenoid synthesis but not in the second year when an intact electron transport chain is already active. While *Soldanella alpina* leaves have similar PTOX contents as *Ranunculus glacialis* leaves (Laureau et al. 2011) it was not determined whether these leaves were formed in the year of measurements or resulted from previous-year leaves. In comparison to *Ranunculus glacialis* leaves, those of *Soldanella alpina* have to cope with more extreme temperature changes during the vegetation period and offer therefore the possibility that high PTOX contents in this plant might similarly function as security valve during rapid temperature change under high light.

Références bibliographiques

- Anderson J.M. (1989) The grana margins of plant thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum* **76**, 243-248
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399
- Aro E.M., Virgin I., Andersson B. (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* **1143**, 113-134
- Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **50**, 601-639
- Asada K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**, 391-396
- Asada K. (1996) Radical production and scavenging in the chloroplasts. In: *Advances in Photosynthesis Vol.5: Photosynthesis and the Environment (N.R. Baker ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht* , pp 123-150
- Atkin O.K., Millar A.H., Gardeström P., Day D.A. (2000) Photosynthesis, carbohydrate metabolism and respiration in leaves of higher plants. In: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism (R.C. Leegood, T.D. Sharkey, S. von Caemmerer eds) Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London* **9**, 154-175
- Backhausen J.E., Kitzmann C., Horton P., Scheibe R. (2000) Electron acceptors in isolated intact spinach chloroplasts act hierarchically to prevent over-reduction and competition for electrons. *Photosynthesis Research* **64**, 1-13
- Baker N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 89-113
- Barry R.G. (2008) Mountain, weather and climate. Cambridge University Press 3rd edition.
- Berry J., Björkman O. (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 491-543
- Blumthaler M., Ambach W., Ellinger R. (1997) Increase in solar UV radiation with altitude. *Journal of photochemistry and Photobiology B: Biology* **39**, 130-134
- Bravo L.A., Saavedra-Mella F.A., Vera F., Guerra A., Cavieres L.A., Ivanov A., Huner N.P.A., Corcuera L.J. (2007) Effect of cold acclimation on the photosynthetic performance of two ecotypes of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3581-3590

- Busch F., Hüner N.P.A., Ensminger I. (2008) Increased air temperature during simulated autumn conditions impairs photosynthetic electron transport between photosystem II and photosystem I). *Plant Physiology* **147**, 402-414
- Caldwell M. M., Bornman J. F., Ballaré C. L., Flint S. D., Kulandaivelu G. (2007) Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **6**, 252-266
- Carol P., Kuntz M. (2001) A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends in Plant Science* **6**, 31-36
- Cartellieri E. (1940) Über die Transpiration und Kohlensäureassimilation an einem hochalpinen Standort. *Sitzungsberichte der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse Abteilung I* **149**, 95-143
- Conklin P.L., Williams E.H., Last R.L. (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **93**, 9970-9974
- Cornic G., Bukhov N.G., Wiese C., Bligny R., Heber U. (2000) Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C3 plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta* **210**, 468-477
- Cournac L., Redding K., Ravenel J., Rumeau D., Josse E.M., Kuntz M., Peltier G. (2000) Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17256-17262
- Cramer W.A., Hasan S.S., Yamashita E. (2011) The Q cycle of cytochrome bc complexes: a structure perspective. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 788-802
- Demmig-Adams B., Ebbert V., Mellman D.L., Mueh K.E., Schaffer L., Funk Ch., Zarter C.R., Adamska I., Jansson St., Adams III W.W. (2006) Modulation of PsbS and flexible vs sustained energy dissipation by light environment in different species. *Physiologia Plantarum* **127**, 670-680
- Diaz M., De Haro V., Munoz R., Quiles M.J. (2007) Chlororespiration is involved in the adaptation of Brassica plants to heat and high light intensity. *Plant Cell and Environment* **30**, 1578-1585
- Diemer M., Körner Ch. (1996) Lifetime leaf carbon balances of herbaceous perennial plants from low and high altitudes in the central alps. *Functional Ecology* **10**, 33-43

- Driever St.M., Baker N.R. (2011) The water-water cycle in leaves is not a major alternative electron sink for dissipation of excess excitation energy when CO₂ assimilation is restricted. *Plant, Cell and Environment* **34**, 837-846
- Evans J.R., Kaldenhoff R., Genty B., Terashima I. (2009) Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2235-2248
- Evans J.R., Loreto F. (2000) Acquisition and diffusion of CO₂ in higher plant leaves. In: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism* (R.C. Leegood, T.D. Sharkey, S. von Caemmerer eds) *Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London* **9**, 332-351
- Falk S., Maxwell D.P., Laudenbach D.E., Huner N.P.A. (1996) Photosynthetic adjustment to temperature. In: *Advances in Photosynthesis Vol.5: Photosynthesis and the Environment* (N.R. Baker ed.) *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht* , pp 367-385
- Feierabend J. (2005) Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. in: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, ed. N. Smirnoff *Blackwell Publishers Oxford* , 101-140
- Finazzi G., Johnson G.N., Dalosto L., Joliot P., Wollman F.-A., Bassi R. (2004) A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**, 12375-12380
- Fortunato A.S., Lidon F.C., Batista-Santos P., Leitao A.E., Pais I.P., Ribeiro A.I., Ramalho J.C. (2010) Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Plant Physiology* **167**, 333-342
- Foyer C.H. (1993) Ascorbic acid. In: *Antioxidants in Higher Plants* (Alscher R.G., Hess J.L. eds) *CRC-Press, Boca Raton* , pp 31-58
- Foyer C.H. (1997) Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defences* (ed. J.G. Scandalios) *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Monographs 34* , 587-621
- Foyer C.H., Noctor G. (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment* **28**, 1056-1071
- Foyer Ch. H., Noctor G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**, 2-18
- Foyer Ch. H., Shigeoka S. (2011) Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology* **155**, 93-100

- Friend A.D., Woodward F.I. (1990) Evolutionary and ecophysiological responses of mountain plants to the growing season environment. *Advances in Ecological Research* **20**, 59-124
- Fu A., Aluru M., Rodermeil S.R., (2009) Conserved active sequences in Arabidopsis plastid terminal oxidase (PTOX). *The journal of biological chemistry* **284**, 22625-22632
- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. (1989) The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **990**, 87-92
- Germino M.J., Smith W.K. (2001) Relative importance of microhabitat, plant form and photosynthetic physiology to carbon gain in two alpine herbs. *Functional Ecology* **15**, 243-251
- Ghashghaie J., Cornic G. (1994) Effect of temperature on partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ assimilation and O₂ reduction and on the CO₂/O₂ specificity of RubisCo. *Journal of Plant Physiology* **143**, 643-650
- Gomez L.D., Noctor G., Knight M.R., Foyer C.H. (2004) Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1851-1859
- Guy C.L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **41**, 187-223
- Havaux M. (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* **3**, 147-151
- Havaux M., Dall'Osto L., Bassi R. (2007) Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in Arabidopsis leaves and functions independent of binding of PSII antennae. *Plant Physiology* **145**, 1506-1520
- Heyno E., Gross C.M., Laureau C., Culcasi M., Pietri S., Krieger-Liszkay A. (2009) Plastid alternative oxidase (PTOX) promotes oxidative stress when overexpressed in tobacco. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 31174-31180
- Hodges D.M., Andrews C.J., Johnson D.A., Hamilton R.I. (1996) Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive maize lines. *Physiologia Plantarum* **98**, 685-692
- Horton P., Ruban A.V., Walters R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **47**, 655-684
- Houille-Vernes L. Rappaport F., Wollmann F.-A., Alric J., Johnson X. (2011) Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **108**, 20820-20825

- Huner N.P.A., Öquist G., Sarhan F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* **3**, 224-230
- Hurry V., Strand Å., Furbank R., Stitt M. (2000) The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **24**, 383-396
- Hurry V.M., Keerberg O., Pärnik T., Gardeström P., Öquist G. (1995) Cold-hardening results in increased activity of enzymes involved in carbon metabolism in leaves of winter rye (*Secale cereale* L.) *Planta* **195**, 554-562
- Hurry V.M., Malmberg G., Gardeström P., Öquist G. (1994) Effects of a short-term shift to low temperature and of long-term cold hardening on photosynthesis and ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and sucrose phosphate synthase activity in leaves of winter rye (*Secale cereale* L.). *Plant Physiology* **106**, 983-990
- Ibanez H., Ballester A., Munoz R., Quiles M.J. (2010) Chlororespiration and tolerance to drought, heat and high illumination. *Journal of Plant Physiology* **167**, 732-738.
- Järvinen A., (1989) The life history of *Ranunculus glacialis*, an arctic-alpine perennial herb, in Finnish Lapland. *Holarctic ecology* **12**, 152-162
- Joet T., Genty B., Josse E.-M., Kuntz M., Cornac L., Peltier G. (2002) Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 31623-31630
- Joliot P., Joliot A. (2005) Quantification of cyclic and linear flows in plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **102**, 4913-4918
- Josse E.-M., Simkin A.J., Gaffé J., Labouré A.-M., Kuntz M., Carol P. (2000) A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiology* **123**, 1427-1436
- Kleier C., Rundel P. (2009) Energy balance and temperature relations of *Azorella compacta*, a high-elevation cushion plant of the central Andes. *Plant Biology* **11**, 351-358
- Kocsy G., Szalai G., Vagujfalvi A., Stehli L., Orosz G., Galiba G. (2000) Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* **210**, 295-301
- Kocsy G., Toth B., Berzy T., Szalai G., Jednakovits A., Galiba G. (2001) Glutathione reductase activity and chilling tolerance are induced by a hydroxylamine derivative BRX-156 in maize and soybean. *Plant Science* **160**, 943-950

- Kocsy G., von Ballmoos P., Suter M., Rügsegger A., Galli U., Szalai G., Galiba G., Brunold C. (2000) Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. *Planta* **211**, 528-536
- Kogami H., Hanba Y.T., Kibe T., Terashima I., Masuzawa T. (2001) CO₂ transfer conductance, leaf structure and carbon isotope composition of *Polygonum cuspidatum* leaves from low and high altitudes. *Plant Cell and Environment* **24**, 529-538
- Körner C. (1999) Alpine plant life. Functional plant ecology of high mountain ecosystems. *Springer Verlag Berlin Heidelberg* ,
- Körner C. (2003) Alpine plant life. Functional plant ecology of high mountain ecosystems. Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Körner Ch., Diemer M. (1987) In situ photosynthetic responses to light, temperature and carbon dioxide in herbaceous plants from low and high altitude. *Functional Ecology* **1**, 179-194
- Kozaki A., Takeba G. (1996) Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. *Nature* **384**, 557-560
- Krall J.P., Edwards G.E. (1992) Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiologia Plantarum* **86**, 180-187
- Krause G.H., Weis E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **42**, 313-349
- Krieger-Liszkay A., Fufezan C., Trebst A. (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* **98**, 551-564
- Krömer S., Scheibe R. (1996) Function of the chloroplastic malate valve for respiration during photosynthesis. *Biochemical Society Transactions* **24**, 761-766
- Krömer S. (1995) Respiration during photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **46**, 45-70
- Kruk J., Holländer-Czytko H., Oettmeier W., Trebst A. (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of Plant Physiology* **162**, 749-757
- Kumar N., Kumar S., Ahuja P.S. (2005) Photosynthetic characteristics of *Hordeum*, *Triticum*, *Rumex* and *Trifolium* species at contrasting altitude. *Photosynthetica* **43**, 195-201
- Kumar N., Vyas D., Kumar S. (2007) Plants at high altitude exhibit higher component of alternative respiration. *Journal of Plant Physiology* **164**, 31-38
- Larcher W., Kainmüller C., Wagner J. (2010) Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora* **205**, 3-18

- Larcher W., Wagner J., Lütz C. (1997) The effect of heat on photosynthesis, dark respiration and cellular ultrastructure of the arctic-alpine psychrophyte *Ranunculus glacialis*. *Photosynthetica* **34**, 219-232
- Laureau C., Bligny R., Streb P. (2011) The significance of glutathione for photoprotection at contrasting temperatures in the alpine plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *Physiologia Plantarum* **143**, 246-260
- Leegood R.C., Edwards G.E. (1996) Carbon metabolism and photorespiration: Temperature dependence in relation to other environmental factors. *In: Advances in Photosynthesis Vol.5: Photosynthesis and the Environment (N.R. Baker ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, pp 191-221
- Lennon A.M., Prommeenate P., Nixon P.J. (2003) Location, expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, Ndh and IMMUTANS, in higher-plant plastids. *Planta* **218**, 254-260
- Li Z., Wakao S., Fischer B.B., Niyogi K.K. (2009) Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 239-260
- Mächler F., Nösberger J. (1978) The adaptation to temperature of photorespiration and of the photosynthetic carbon metabolism of altitudinal ecotypes of *Trifolium repens* L. *Oecologia* **35**, 267-276
- Manuel N., Cornic G., Aubert S., Choler P., Bligny R., Heber U. (1999) Protection against photoinhibition in the alpine plant *Geum montanum*. *Oecologia* **119**, 149-158
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, 659-668
- May M.J., Vernoux T., Leaver C., van Montagu M., Inze D. (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* **49**, 649-667
- McDonald A.E., Ivanov A.G., Bode R., Maxwell D.P., Rodermel S.R., Hüner N.P.A. (2011) Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 954-967
- Meyer A.J. (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology* **165**, 1390-1403
- Miyake C., Asada K. (1994) Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant & Cell Physiology* **35**, 539-549

- Moller I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **52**, 561-591
- Moller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 459-481
- Mooney H.A., Billings W.D. (1961) Comparative physiological ecology of arctic and alpine populations of *Oxyria digyna*. *Ecological Monographs* **31**, 1-29
- Moser W. (1970) Microclimate and photosynthesis in the nivalzone of the alps. *IBP-Tundra Biome, Kevo Finland* , 22-33
- Moser W., Brzoska W., Zachhuber K., Larcher W. (1977) Ergebnisse des IBP-Projekts " Hoher Nebelkogel 3184 m" *Sitzungsberichte der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (Wien). Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse, Abteilung I* **186**, 387-419
- Müller P., Li X.-P., Niyogi K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* **125**, 1558-1566
- Munné-Bosch S. (2005) The role of alpa-tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* **162**, 743-748
- Nixon P.J., Rich P.R. (2006) Chlororespiratory pathways and their physiological significance. *In: The Structure and Function of Plastids (Ed: Wise R.R., Hooper J.K.) Springer Netherlands* **Chapter 12**, 237-251
- Niyogi K.K. (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **50**, 333-359
- Noctor G., Foyer C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **49**, 249-279
- Nogués S., Tcherkez G., Streb P., Pardo A., Baptist F., Bligny R., Ghashghaie J., Cornic G. (2006) Respiratory carbon metabolites in the high mountain plant species *Ranunculus glacialis*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3837-3845
- Okegawa Y., Kobayashi Y., Shikanai T. (2010) Physiological links among alternative electron transport pathways that reduce and oxidize plastoquinone in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **63**, 458-468
- Öquist G., Huner N.P.A. (2003) Photosynthesis of overwintering evergreen plants *Annual Review of Plant Biology* **54**, 329-355
- Ort D.R., Baker N.R. (2002) A photoprotective role of O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 193-198

- Osmond C.B. (1981) Photorespiration and photoinhibition, some implications for the energetics of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **639**, 77-98
- Peisker M., Apel H. (2001) Inhibition by light of CO₂ evolution from dark respiration: Comparison of two gas exchange methods. *Photosynthesis Research* **70**, 291-298
- Peltier G., Cournac L. (2002) Chlororespiration. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 523-550
- Pfannschmidt T. (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science* **8**, 33-41
- Polle A. (1997) Defense against photooxidative damage in plants. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defences* (ed. J.G. Scandalios) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Monographs 34, 623-666
- Polle A., Kröniger W., Rennenberg H. (1996) Seasonal fluctuations of ascorbate-related enzymes: acute and delayed effects of late frost in spring on antioxidative systems in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant & Cell Physiology* **37**, 717-725
- Quiles M.J. (2006) Stimulation of chlororespiration by heat and high light intensity in oat plants. *Plant Cell and Environment* **29**, 1463-1470
- Rawat A.S., Purohit A.N. (1991) CO₂ and water vapour exchange in four alpine herbs at two altitudes and under varying light and temperature conditions. *Photosynthesis Research* **28**, 99-108
- Reisigl H., Keller R. (1987) *Alpenpflanzen im Lebensraum*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New-York
- Reiter R., Kanter J. (1982) Time behavior of CO₂ and O₃ in the lower troposphere based on recordings from neighboring mountain stations between 0.7 and 3.0 km ASL including the effects of meteorological parameters. *Theoretical and applied climatology* **30**, 191-225
- Renger G. (1992) Energy transfer and trapping in photosystem II. In: *Topics in Photosynthesis The photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*. (J.Barber ed.) Elsevier **11** pp 45-99
- Rizhsky L., Hallak-Herr E., van Breusegem F., Rachmilevitch S., Barr J.E., Rodermel S., Inze D., Mittler R. (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant Journal* **32**, 329-342
- Rosso D., Ivanov A.G., Fu A., Geisler-Lee J., Hendrickson L., Geisler M., Stewart G., Krol M., Hurry V., Rodermel S.R., Maxwell D.P., Hüner N.P.A. (2006) IMMUTANS does not act as a stress-induced safety valve in the protection of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis* during steady-state photosynthesis. *Plant Physiology* **142**, 574-585

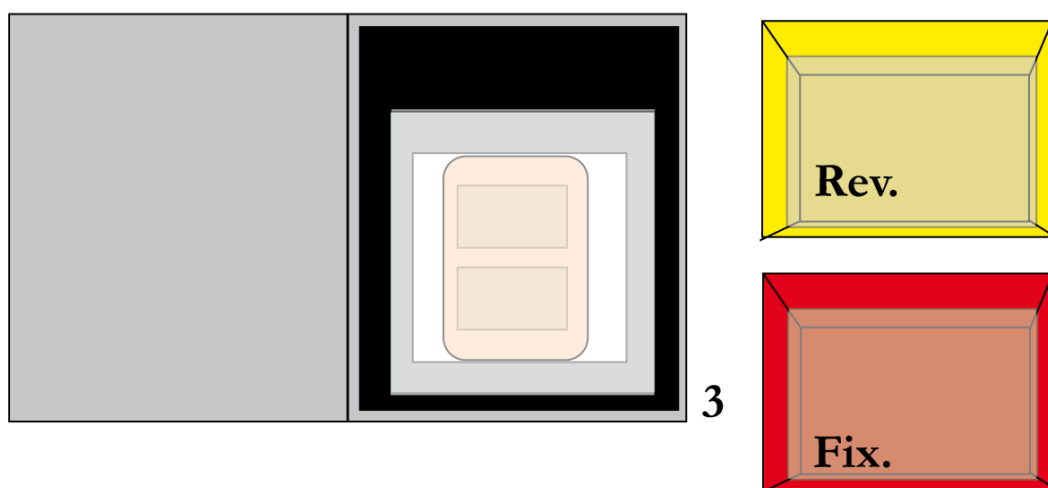
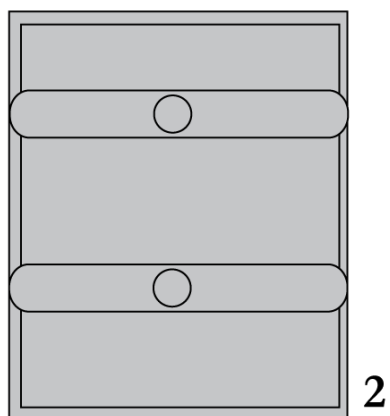
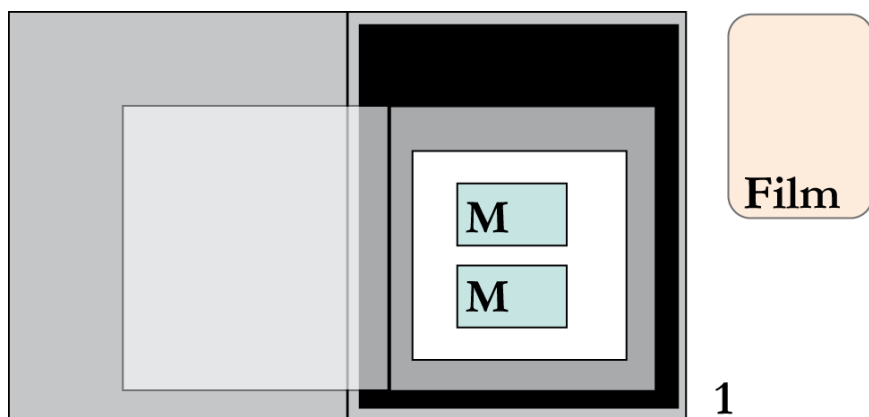
- Rouhier N., Lemaire S.D., Jacquot J.-P. (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 143-66
- Rumeau D., Peltier G., Cournac L. (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell and Environment* **30**, 1041-1051
- Sakata T., Yokoi Y. (2002) Analysis of the O₂ dependency in leaf-level photosynthesis of two *Reynoutria japonica* populations growing at different altitudes. *Plant Cell and Environment* **25**, 65-74
- Savitch L.V., Gray G.R., Huner N.P.A. (1997) Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat. *Planta* **201**, 18-26
- Savitch L.V., Ivanov A.G., Krol M., Sprott D.P., Öquist G., Huner N.P.A. (2010) Regulation of energy partitioning and alternative electron transport pathways during cold acclimation of lodgepole pine is oxygen dependent. *Plant Cell Physiology* **51**, 1555-1570
- Scheibe R. (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia Plantarum* **120**, 21-26
- Scheibe R. (1991) Redox-modulation of chloroplast enzymes. A common principle for individual control. *Plant Physiology* **96**, 1-3
- Scheibe R. (1987) NADP⁺-malate dehydrogenase in C₃-plants: Regulation and role of a light-activated enzyme. *Physiologia Plantarum* **71**, 393-400
- Scheibe R., Backhausen J.E., Emmerlich V., Holtgreffe S. (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1481-1489
- Schönswetter P., Tribsch A., Stehlik I., Nikfeld H., (2004) Glacial history of high alpine *Ranunculus glacialis* (Ranunculaceae) in the European Alps in a comparative phylogeographical context. *Biological Journal of the Linnean Society* **81**, 183-195
- Shahbazi M., Gilbert M., Labouré A.-M., Kuntz M. (2007) Dual role of the plastid terminal oxidase in tomato. *Plant Physiology* **145**, 691-702
- Shang W., Feierabend J. (1998) Slow turnover of the D1 reaction center protein of photosystem II in leaves of high mountain plants. *FEBS Letters* **425**, 97-100
- Smirnoff N. (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 229-235

- Smirnoff N. (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* **78**, 661-669
- Stepien P., Johnson G.N. (2009) Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *Thellungiella*: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant Physiology* **149**, 1154-1165
- Stevens R., Page D., Gouble B., Garchery C., Zamir D., Causse M. (2008) Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant Cell and Environment* **31**, 1086-1096
- Strand A., Hurry V., Henkes S., Huner N., Gustafsson P., Gardeström P., Stitt M. (1999) Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology* **119**, 1387-1397
- Streb P., Aubert S., Bligny R. (2003c) High temperature effects on light sensitivity in the two high mountain plant species *Soldanella alpina* (L) and *Ranunculus glacialis* (L). *Plant Biology* **5**, 432-440
- Streb P., Aubert S., Gout E., Bligny R. (2003a) Reversibility of cold- and light-stress tolerance and accompanying changes of metabolite and antioxidant levels in the two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *Journal of Experimental Botany* **54**, 405-418
- Streb P., Aubert S., Gout E., Bligny R. (2003b) Cold- and light-induced changes of metabolite and antioxidant levels in two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* and a lowland species *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum* **118**, 96-104
- Streb P., Cornic G. (2012) Photosynthesis and antioxidative protection in alpine herbs. In: *Plants in Alpine regions: Cell physiology of adaptation and survival strategies* Springer WienNewYork (Ed. C.Lütz) 75-97.
- Streb P., Feierabend J. (1999) Significance of antioxidants and electron sinks for the cold-hardening-induced resistance of winter rye leaves to photo-oxidative stress. *Plant Cell and Environment* **22**, 1225-1237
- Streb P., Feierabend J., Bligny R. (1997) Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant Cell and Environment* **20**, 1030-1040

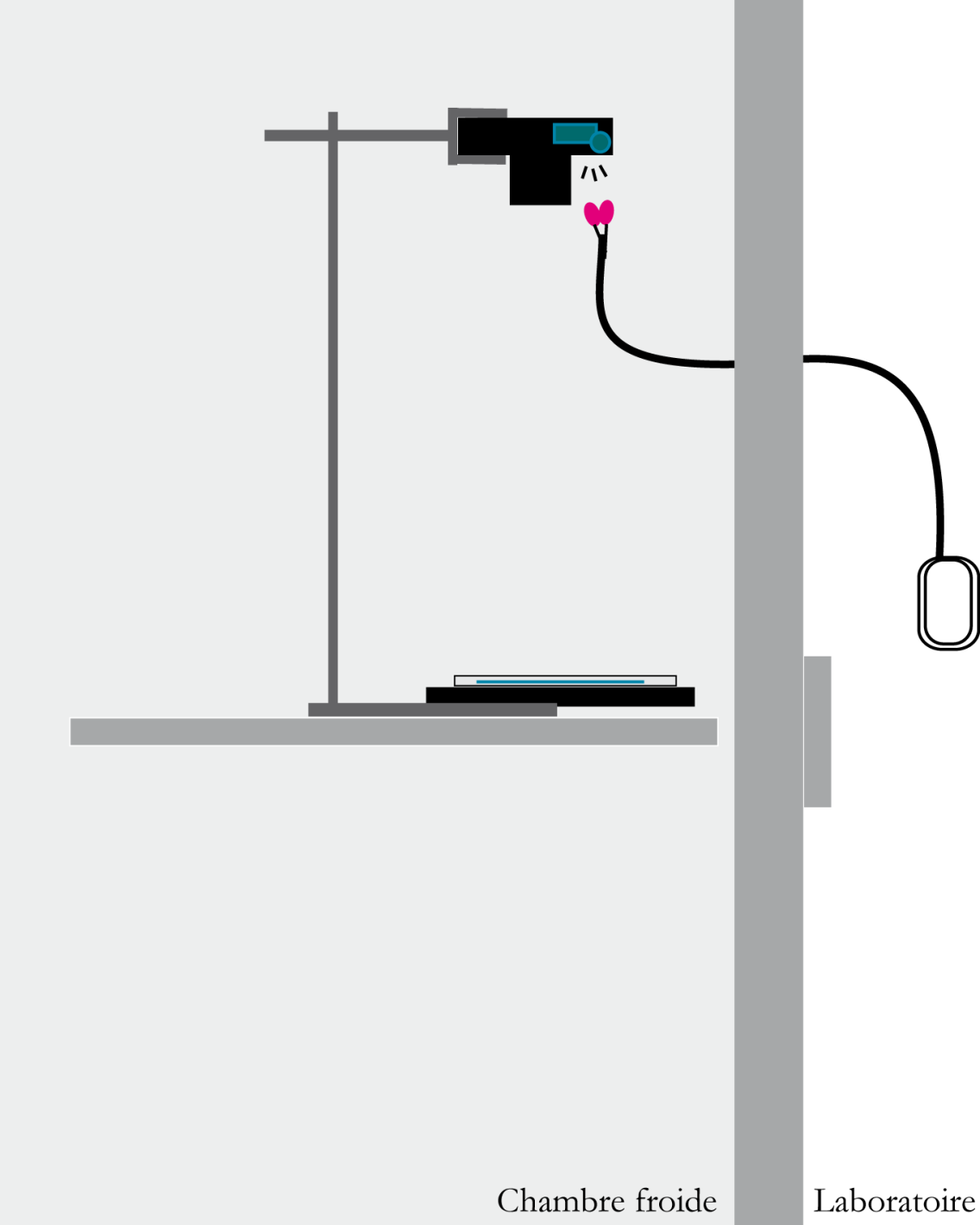
- Streb P., Josse E.-M., Gallouët E., Baptist F., Kuntz M., Cornic G. (2005) Evidence for alternative electron sinks to photosynthetic carbon assimilation in the high mountain plant species *Ranunculus glacialis*. *Plant Cell and Environment* **28**, 1123-1135
- Streb P., Shang W., Feierabend J., Bligny R. (1998) Divergent strategies of photoprotection in high-mountain plants. *Planta* **207**, 313-324
- Sun X., Wen T. (2011) Physiological roles of plastid terminal oxidase in plant stress responses. *Journal of Bioscience* **36**, 1-6
- Takahashi S., Badger M.R. (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science* **16**, 53-60
- Takahashi S., Milward S.E., Yamori W., Evans J.R., Hillier W., Badger M.R. (2010) The solar action spectrum of photosystem II damage. *Plant Physiology* **153**, 988-993
- Takahashi S., Murata N. (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science* **13**, 178-182
- Tallon C., Quiles M.J. (2007) Acclimation to heat and high light intensity during the development of oat leaves increases the NADH DH complex and PTOX levels in chloroplasts. *Plant Science* **173**, 438-445
- Terashima I., Funayama S., Sonoike K. (1994) The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. at low temperature is photosystem I, not photosystem II. *Planta* **193**, 300-306
- Terashima I., Masuzawa T., Ohba H., Yokoi Y. (1995) Is photosynthesis suppressed at higher elevations due to low CO₂ pressure? *Ecology* **76**, 2663-2668
- Trebst A. (1980) Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods in Enzymology* **69**, 675-715.
- Triantaphylides Ch., Krischke M., Hoeberichts F.A., Ksas B., Gresser G., Havaux M., Van Breusegem F., Mueller M.J. (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology* **148**, 960-968
- Ulm R., Nagy F., (2005) Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 477-482
- Valentini R., Epron D., De Angelis P., Matteucci G., Dreyer E. (1995) In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell and Environment* **18**, 631-640
- van Kooten O., Snel J.F.H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* **25**, 147-150

- Wager H.,(1941) On the respiration and carbon assimilation rates of some arctic plants as related to temperature. *New phytologist* **40**, 1
- Walters R.G. (2005) Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany* **56**, 435-447
- Wiese C., Shi L.B., Heber U. (1998) Oxygen reduction in the Mehler reaction is insufficient to protect photosystem I and II of leaves against photoinactivation. *Physiologia Plantarum* **102**, 437-446
- Wildi B., Lütz C. (1996) Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant Cell and Environment* **19**, 138-146
- Williams E.L., Hovenden M.J., Close D.C. (2003) Strategies of light energy utilisation, dissipation and attenuation in six co-occurring alpine heath species in Tasmania. *Functional Plant Biology* **30**, 1205-1218
- Wise R.R. (1995) Chilling-enhanced photooxidation: The production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynthesis Research* **45**, 79-97
- Zhao S., Blumwald E. (1998) Changes in oxidation-reduction state and antioxidant enzymes in the roots of jack pine seedlings during cold acclimation. *Physiologia Plantarum* **104**, 134-142
- Zimmermann W., (1975) Ranunculaceae. *Gustav Hegi—Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Vol 3/3, Paul Parey, Berlin-Hamburg, pp 53–341

Annexe 1 : Etapes de révélation des films photographiques



Annexe 2 : Révélation immunologique en chambre froide



Annexe 3 : Etapes de la synthèse des caroténoïdes

