



HAL
open science

Importance des ROS et des radicaux : de la graine à la membrane plasmique

Catherine Biniek

► **To cite this version:**

Catherine Biniek. Importance des ROS et des radicaux : de la graine à la membrane plasmique. Amélioration des plantes. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS483 . tel-01456224

HAL Id: tel-01456224

<https://theses.hal.science/tel-01456224>

Submitted on 4 Feb 2017

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.

NNT : 2016SACLS483

THÈSE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE À
L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 567
Science du Végétal : du Gène à l'Écosystème (SDV)

Spécialité de doctorat Biologie

Par

Mme Catherine Biniek

Importance des ROS et des radicaux :
de la graine à la membrane plasmique

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 28 novembre 2016 :

Composition du Jury :

Mme Leymarie, Juliette
Mme Corbineau, Françoise
M Mongrand, Sébastien
Mme Vanacker, Hélène
Mme Krieger-Liszkay, Anja

Professeur, Université Paris Est Créteil
Professeur, UPMC Sorbonne Universités
Directeur de Recherche, CNRS Bordeaux
Maître de Conférence, Université Paris-Saclay
Directrice de Recherche, CEA Saclay

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directrice de thèse

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de thèse Anja Krieger-Liszkay, qui m'a accueilli dans son équipe et m'a encadré pendant ces 3 années. Je la remercie pour ses conseils et pour avoir toujours su me proposer un nouveau sujet de travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail. Merci aux rapporteurs Françoise Corbineau et Sébastien Mongrand et aux examinateurs Juliette Leymarie et Hélène Vanacker. Merci à Françoise Corbineau qui a su me transmettre sa passion pour la recherche lors de mon stage M1 et pour son soutien lors de mes passages dans son laboratoire.

Je remercie toute mon équipe. Merci beaucoup à Pierre Sétif pour ses conseils en général et surtout en biochimie ainsi que pour la relecture avisée de ce manuscrit. Merci à Diana Kirilovsky pour ses conseils. Merci à Adjélé Wilson et Céline Bourcier pour leur aide dans l'optimisation du protocole d'expression de NQR chez *E.Coli*. Merci à Adrien Thurotte pour son soutien. Merci à Kathleen Feilke de m'avoir aidé à faire mes premiers pas dans le labo. Merci à Sandrine Cot pour son aide technique. Je vous remercie pour tous les repas et les pauses thés/café passés ensemble !

Je suis reconnaissante aux différentes personnes avec qui j'ai collaboré « hors les murs » ou « hors les barbelés » du CEA. Merci à Eiri Heyno pour m'avoir légué les lignées homozygotes stables de certains mutants et pour m'avoir appris à les génotyper. Merci beaucoup à Boris Collet de l'INRA de Versailles pour son aide technique au niveau des traitements de détérioration contrôlée. Et merci à toute la plateforme de Loïc Rajjou pour les moments sympas passés à l'INRA. Merci à l'équipe de Christophe Bailly pour m'avoir accueillie lors de mes passages dans leur labo.

J'ai eu la chance d'être financée par le projet européen ECOSEED. Je tiens à remercier chaleureusement Ilse Kranner pour la coordination et l'organisation qu'elle a su apporter dans ce consortium de 11 équipes. Merci aux différents partenaires pour avoir organisé les assemblées générales. Merci à Derek Bewley pour nos conversations à ces occasions. Merci à Manuela Nagel et Andreas Borner d'avoir organisé le congrès passionnant à Wernigerode.

Je tiens à remercier les membres de l'ED 567 Sciences du Végétal. Merci à Jacqui Shykoff et à Marianne Delarue qui ont été à l'écoute et de bon conseil. Je remercie tous les membres de l'iBiThèse qui ont su me changer les idées et me sortir de mon labo.

Merci à Thanh-Lan Lai pour m'avoir accueillie dans son bureau et de m'avoir permis de prendre du recul sur ma thèse.

Enfin un grand merci à mes meilleures amies qui ont toujours été là pour moi, Laure, Cécile et Amandine.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma famille. Merci beaucoup à ma mère, à mes frères Christophe et Yarek et à mes sœurs Ania et Margaret pour m'avoir soutenu et s'être intéressé à mon travail.

Et pour finir, merci Guillaume de m'avoir soutenu et supporté au quotidien. <<

Résumé

L'objectif de cette thèse est de (1) définir l'effet de l'environnement maternel et des radicaux organiques sur la qualité des graines de 4 espèces (*Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*, *Brassica oleracea* et *Hordeum vulgare*), (2) caractériser deux mutants d'*A.thaliana* affectés au niveau d'enzymes de la membrane plasmique qui pourraient jouer un rôle dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et (3) caractériser l'activité de ces deux protéines.

Des dosages de superoxyde par spectroscopie UV-visible et de radicaux par spectroscopie RPE ont été faits sur des graines issues de plantes ayant subi des stress thermique et/ou hydrique. Les mesures n'ont pas montré d'effet des stress appliqués sur les plantes mères. Des traitements de vieillissement accéléré ont eu des effets négatifs sur la vigueur et la viabilité des graines. Différents radicaux ont été identifiés par RPE haut champ au niveau de l'enveloppe : de l'épi-catéchine chez *Arabidopsis thaliana* et du manganèse (II) chez *Brassica oleracea* mais aussi du péricarpe : de la mélanine chez *Helianthus annuus*. Cependant, étant donné la localisation de ces radicaux, ils ne sont pas de bons marqueurs de la qualité des graines.

Des mutants KO d'*A.thaliana* de différentes quinones réductases (QR) ainsi que de AIR12 ont été caractérisés. Les QR sont des enzymes cytosoliques ayant une affinité pour la membrane plasmique. Elles catalysent la réduction de quinones en dihydroquinones et jouent un rôle protecteur contre le stress oxydatif. A pH alcalin par contre, les dihydroquinones se déprotonent et s'autooxydent ce qui entraîne la formation de semiquinones et de $O_2^{\cdot-}$. AIR12 est un cytochrome b 561 ancré à la membrane plasmique du côté de l'apoplaste qui peut être réduit par l'ascorbate et le $O_2^{\cdot-}$. Ces protéines pourraient être impliquées dans un transfert d'électrons à travers la membrane plasmique *via* la vitamine K1. Les mutants *nqr*, *fqr1* et *nqrfqr1* produisent plus de $O_2^{\cdot-}$ que le sauvage. Le double mutant *nqrrair12* a une germination 2 fois plus rapide que le sauvage à 15°C ce qui est corrélé à une production de $O_2^{\cdot-}$ plus importante. Afin de tester l'hypothèse du transfert d'électrons, les protéines recombinantes NQR et AIR12 ont été produites. Le potentiel rédox de NQR a été estimé à -209 mV. A pH alcalin, AIR12 est réduit par les semiquinones. Cela indique que AIR12 pourrait récupérer les électrons du produit de NQR à pH alcalin. En présence de fragments de membrane plasmique

d'hypocotyle de soja contenant de la vitamine K1, la production de O_2^- est augmentée en présence de NQR et diminuée en présence de NQR et AIR12. L'ensemble de ces résultats indique que les QR semblent avoir un rôle anti-oxydant mais aussi pro-oxydant selon les cas et que AIR12 semble avoir un rôle anti-oxydant. Le transfert d'électrons entre les deux protéines pourrait se faire *via* les semiquinones à pH alcalin et *via* O_2^- .

Summary

The aim of this work is to (1) define the effects of adverse environmental conditions and radicals on seed quality of 4 species (*Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*, *Brassica oleracea* et *Hordeum vulgare*), (2) characterize two *A.thaliana* mutants affected in plasma membrane proteins that may play a role in reactive oxygen species (ROS) generation and (3) characterize the activity of the two proteins.

Seeds were harvested from plants subjected to drought and/or thermal stress. Then superoxide anion radicals and organic radicals in seeds were measured by UV-visible and EPR spectroscopy, respectively. The measurements showed that the stress have no impact on seed superoxide and radical production. Accelerated ageing had a negative effect on seed vigor and viability. Several radicals have been identified by high field EPR. In the testa of *Arabidopsis thaliana* we have found an epi-catechin radical and in *Brassica oleracea* a large signal of manganese (II). In *Helianthus annuus*' pericarp we have found a melanin radical. There was no correlation between these radicals and the seed quality, therefore these radicals were not found to be good markers of seed quality.

A.thaliana KO mutants of quinone reductase (QR) and AIR12 have been characterized. QR are cytosolic enzymes that have an affinity for the plasma membrane. QR catalyze the reduction of quinone to dihydroquinone. Thus they are known to be protective enzymes against oxidative stress. However, at alkaline pH, dihydroquinone deprotonize and form semiquinones and $O_2^{\cdot-}$. AIR12 is a b561 cytochrome anchored to the apoplasmic side of the plasma membrane. These two proteins could be implied in a transmembrane electron transport via vitamin K1. *nqr*, *fqr1* and *nqrfqr1* mutants produce more $O_2^{\cdot-}$ than the WT. The double mutant *nqrair12* germinated twice faster at 15°C than the WT and produce also more $O_2^{\cdot-}$. To test the hypothesis of electron transfer, recombinant proteins and NQR and AIR12 were produced. The redox potential was estimated to be -209 mV. At alkaline pH, AIR 12 was reduced by the semiquinone. This indicates that AIR12 could form a redox couple with vitamin K1 as electron shuttle across the membrane.

In the presence of plasma membrane fragments of soybean hypocotyl containing vitamin K1, the production $O_2^{\cdot-}$ was increased in the presence of NQR and reduced in the presence of NQR and AIR12. All these findings indicate that the QR appear to have an anti-

oxidant role but also pro-oxidant according to the conditions and that AIR12 seems to have an anti-oxidant role. Electron transfer between the two proteins could be done *via* the semiquinone at alkaline pH and *via* $O_2^{\cdot -}$.

Table des matières

Remerciements.....	1
Résumé.....	3
Summary.....	5
Table des matières.....	7
Abréviations.....	12

1. Introduction..... 15

1.1 Qu'est ce qu'un ROS ?..... 16

1.2 La production de ROS dans les plantes..... 17

1.2.1 Les chaînes de transport d'électrons..... 18

1.2.1.1 Les chloroplastes..... 18

1.2.1.2 Les mitochondries..... 19

1.2.1.3 Les réactions de Fenton et de Haber-Weiss..... 20

1.2.2 Les voies de production enzymatiques..... 20

1.2.2.1 Dans les organites..... 20

1.2.2.1.1 Le péroxysome..... 20

1.2.2.1.2 Le réticulum endoplasmique..... 21

1.2.2.2 La membrane plasmique..... 21

1.2.2.2.1 Les NADPH oxydases..... 22

1.2.2.2.2 Les NAD(P)H :quinone oxydoréductases..... 23

1.2.2.3 La paroi cellulaire..... 27

1.2.2.3.1 Les péroxydases de classe III..... 28

1.2.2.3.2 Les amine oxydases..... 29

1.2.2.3.3 Les oxalate oxydases..... 30

1.3 La détoxification des ROS..... 30

1.3.1 Les molécules antioxydantes à faible poids moléculaire..... 31

1.3.1.1 L'ascorbate..... 31

1.3.1.2 Le glutathion..... 32

1.3.1.3 Le tocophérol..... 32

1.3.1.4 Les caroténoïdes, les flavonoïdes et la proline..... 33

1.3.2 Les enzymes antioxydantes..... 33

1.3.2.1 La superoxyde dismutase..... 33

1.3.2.2 La catalase..... 33

1.3.2.3 L'ascorbate peroxydase..... 34

1.3.2.4 La monodéhydroascorbate réductase..... 34

1.3.2.5 La déhydroascorbate réductase..... 35

1.3.2.6 La glutathion réductase..... 35

1.4 Le rôle des ROS dans l'élongation cellulaire..... 36

1.4.1 État de l'art..... 37

1.4.2 Hypothèse d'un transfert d'électrons à travers la membrane plasmique..... 38

1.5 Le rôle des ROS sur la qualité des graines..... 40

1.5.1 Définition de la qualité des graines..... 40

1.5.2 Influence de la plante mère sur la qualité des graines..... 41

1.5.3 Accumulation de ROS dans les graines sèches et vieillissement naturel.....	42
1.5.4 Le rôle des ROS dans la germination.....	43
1.5.4.1 Définition de la germination.....	43
1.5.4.2 Effet des ROS dans la germination.....	44
1.5.4.3 Vieillissement des semences et ROS.....	45
1.5.4.4 Théorie de la fenêtre oxydative.....	46
1.6 Objectifs de la thèse.....	47
2. Matériels et Méthodes.....	49
2.1 Description du matériel végétal.....	50
2.1.1 Production de 4 espèces de graines (ECOSEED).....	50
2.1.1.1 <i>Helianthus annuus</i>	50
2.1.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
2.1.1.3 <i>Brassica oleracea</i>	51
2.1.1.4 <i>Hordeum vulgare</i>	51
2.1.2 Matériel végétal pour les projets nqr/ air12.....	52
2.1.2.1 Provenance des graines.....	52
2.1.2.2 Production des graines.....	52
2.2 Masse du matériel végétal.....	52
2.2.1 Masse de graines sèches produites par plantes.....	52
2.2.2 Masse des graines sèches.....	53
2.2.3 Masse des plantes adultes.....	53
2.3 Physiologie du développement précoce d'<i>A.thaliana</i>.....	53
2.3.1 Tests de germination.....	53
2.3.1.1 Germination en lumière continue.....	53
2.3.1.2 Germination à l'obscurité.....	54
2.3.1.3 Germination en conditions d'hypoxie.....	54
2.3.2 Traitement de détérioration contrôlée.....	54
2.3.2.1 Pour 4 espèces de graines (ECOSEED).....	55
2.3.2.2 Pour le projet QR.....	55
2.3.3 Croissance de la racine.....	55
2.4 Mesure de paramètres photosynthétiques par IMAGING-PAM.....	56
2.5 Biochimie des protéines.....	57
2.5.1 Dosage des protéines.....	57
2.5.1.1 Méthode de Bradford.....	57
2.5.1.2 Méthode par amidoblack.....	57
2.5.2 SDS-PAGE.....	58
2.5.2.1 Préparation du gel et des échantillons, migration.....	58
2.5.2.2 Coloration du gel au bleu de Coomassie.....	58
2.5.2.3 Coloration du gel au nitrate d'argent.....	59
2.5.2.4 Western Blot.....	59
2.6 Étude de l'état redox des graines et des plantules.....	60
2.6.1 Dosages d'espèces réactives de l'oxygène.....	60
2.6.1.1 Dosage du superoxyde par spectroscopie UV-visible.....	60
2.6.1.2 Dosage de peroxyde d'hydrogène par spectroscopie à fluorescence.....	61
2.6.1.3 Dosage du radical hydroxyl par RPE.....	62

2.6.2	Activité d'enzymes anti-oxydantes.....	63
2.6.2.1	Catalase.....	63
2.6.2.2	Superoxyde dismutase.....	63
2.6.2.3	Guaïacol peroxydase.....	64
2.7	Production de la protéine recombinante NQR chez <i>E.coli</i>.....	64
2.7.1	Milieux de culture des bactéries.....	64
2.7.2	Transformation par choc thermique.....	64
2.7.3	Expression hétérologue de AtNQR.....	65
2.8	Purification de la protéine recombinante AtNQR.....	65
2.9	Caractérisation du cofacteur de NQR.....	66
2.9.1	Spectres de réduction de NQR.....	66
2.9.2	Fluorescence du FMN libre après dénaturation de NQR.....	66
2.9.3	Titration du FMN par fluorescence en présence de NQR.....	67
2.9.4	Mesure de l'activité.....	67
2.10	Electrochimie : titration rédox.....	68
2.10.1	Titration du méthylviologène.....	68
2.10.2	Titration du FMN.....	69
2.10.3	Titration de NQR.....	69
2.11	Cinétique d'oxydation du MDH₂ en présence de AIR12.....	69
2.12	Analyse des données.....	69
3.	Evaluation de la qualité des graines : projet ECOSEED.....	70
3.1	Introduction.....	71
3.2	<i>Helianthus annuus</i>.....	71
3.2.1	Germination.....	72
3.2.2	Production de superoxyde dans des graines sèches et imbibées.....	72
3.2.3	Les radicaux mesurés par RPE à haut champ.....	73
3.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>.....	73
3.3.1	Germination.....	73
3.3.2	Le superoxyde dans des graines sèches et imbibées.....	74
3.3.3	Les radicaux mesurés par RPE à haut champ.....	74
3.4	<i>Brassica oleracea</i>.....	75
3.4.1	Germination.....	75
3.4.2	Le superoxyde dans des graines sèches et imbibées.....	76
3.4.3	Les radicaux mesurés par RPE à haut champ.....	76
3.5	<i>Hordeum vulgare</i>.....	76
3.5.1	Germination.....	77
3.6	Discussion.....	77
4.	Rôle des quinones réductases dans la germination et le développement précoce d'<i>A.thaliana</i>.....	79
4.1	Introduction.....	80
4.2	Description des mutants.....	80
4.2.1	Sélection des mutants.....	80
4.2.2	Vérification des mutants.....	81

4.2.3	Masse des graines.....	81
4.2.3.1	Production de graines par les plantes mères.....	81
4.2.3.2	Poids de 1000 graines sèches.....	82
4.2.4	Croissance des racines de plantules.....	82
4.2.5	Croissance des plantes.....	82
4.2.5.1	Masse de plantes de 3 semaines.....	82
4.2.5.2	Effet des QR sur la photosynthèse.....	83
4.3	Physiologie de la germination des semences d'<i>A.thaliana</i>.....	84
4.3.1	Effet de la température.....	84
4.3.2	Effet de la lumière.....	85
4.3.3	Effet de l'oxygène.....	85
4.3.4	Effet du traitement de détérioration contrôlé.....	86
4.4	Étude du métabolisme ROS lors du développement précoce des mutants	
QR.....		86
4.4.1	Production de ROS dans les semences imbibées.....	86
4.4.2	Activité des enzymes anti-oxydantes dans des plantules.....	86
4.5	Discussion.....	87
5.	Rôle de AIR12 et NQR dans la germination et le développement précoce d'<i>A.thaliana</i>.....	91
5.1	Introduction.....	92
5.2	Description des mutants.....	92
5.2.1	Sélection des mutants.....	92
5.2.2	Masse des graines produites par les plantes mères.....	92
5.2.3	Poids de 1000 graines.....	93
5.2.4	Croissance des racines de plantules.....	93
5.2.5	Croissance des plantes.....	93
5.3	Physiologie de la germination des semences d'<i>A.thaliana</i>.....	94
5.3.1	Effet de la température.....	94
5.3.2	Effet de la lumière.....	95
5.4	Étude du métabolisme ROS lors du développement précoce des mutants	
QR.....		95
5.4.1	Production de ROS dans les semences imbibées.....	95
5.4.2	Production du radical hydroxyl dans des plantules.....	96
5.4.3	Activité des enzymes anti-oxydantes dans des plantules.....	96
5.5	Discussion.....	97
6.	Caractérisation des protéines recombinantes NQR et AIR12. 100	
6.1	Caractérisation de la protéine recombinante AtNQR.....	101
6.1.1	Production d'une flavoprotéine active.....	101
6.1.1.1	Production hétérologue.....	101
6.1.1.2	Spectres de l'enzyme oxydée et réduite.....	101
6.1.1.5	Activité de NQR avec différentes quinones.....	102
6.1.2	Évaluation du FMN lié à NQR.....	102
6.1.2.1	Calcul du ratio protéine : FMN.....	102

6.1.2.2 Dénaturation de NQR.....	103
6.1.3 Reconstitution de NQR avec du FMN libre.....	103
6.1.3.1 Suivi de la reconstitution par fluorescence.....	103
6.1.3.2 Augmentation de l'activité de NQR après la reconstitution.....	105
6.1.4 Titration rédox de NQR.....	105
6.1.4.1 Détermination du potentiel rédox par spectro-électrochimie.....	105
6.1.4.2 Contrôle de l'état de liaison du FMN à NQR.....	106
6.2 Caractérisation de la protéine recombinante AtAIR12.....	106
6.2.1 Effet de AIR12 sur l'oxydation de MDH ₂	107
6.2.1.1 Rôle du pH.....	107
6.2.1.2 Rôle de AIR12.....	108
6.3 Interaction de NQR et AIR12.....	108
6.4 Discussion.....	109
7. Perspectives.....	112
Références bibliographiques.....	115
Annexes.....	130
Article 1.....	131
Article 2.....	147
Article 3.....	158

Abréviations

ABA	Acide abscissique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AIR12	Auxin induced in root cultures 12
AO	Amine oxydase
AOX	Alternative Oxydase
APX	Ascorbate peroxydase
ARN	Acide ribonucléique
ASA	Ascorbate
ATP	Adénosine triphosphate
BQ	1,4-benzoquinone
CAT	Catalase
CDPK	Calcium-dependent/calmodulin-like domain protein kinases
CDT	Controlled Deterioration Treatment
Chl	Chlorophylle
Cyt	Cytochrome
CYB561	Cytochrome de type b561
DHA	Dihydroascorbate
DHAR	Dihydroascorbate réductase
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ETF	Electron transferring flavoprotein
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
FQR	Flavodoxin-like quinone réductase
GA	Acide gibbérellique
GLP	Germine-like protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit

GSSG	Glutathion oxydé
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute pression
HR	Humidité relative
ISTA	International Seed Testing Agency
KO	Knock-out
MD	Ménadione
MDA	Malondialdéhyde
MDHA	Monodéhydroascorbate
MDHAR	Monodéhydroascorbate réductase
MV	Méthylviologène
NAD(P)	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
<i>Nox</i>	NADPH oxydase
NQ	1,4-naphtoquinone
NQR	NAD(P)H : quinone oxydoréductase
NS	Non stratifié
OXO	Oxalate oxydase
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAO	Polyamine oxydase
PCR	Polymerase chain reaction
PQ	Plastoquinone
PRX	Péroxydase
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Q	Quinone
QR	Quinone réductase
<i>Rboh</i>	Respiratory burst oxidase homologue
RE	Réticulum endoplasmique
Redox	Oxydo-réduction
ROS	Reactive oxygen species
RPE	Résonance paramagnétique électronique
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase
S	Stratifié

SDS	Sodium dodécyl sulfate
SHE	Standard Hydrogen Electrode
SOD	Superoxyde dismutase
T	température
UV	Ultra-violet
WT	Wild type
XOD	Xanthine oxydase

1. Introduction

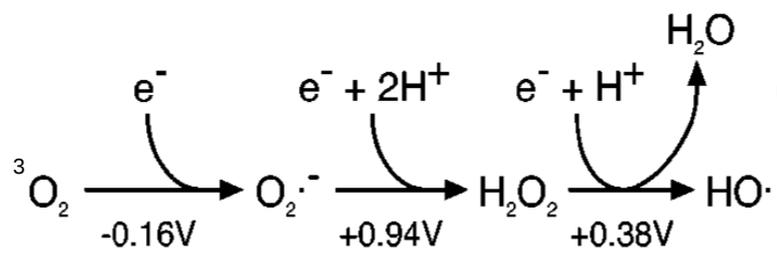


Figure 1 : Génération de différents ROS par réduction successive de l'oxygène. Les électrons sont représentés par e⁻. Les chiffres sous les flèches indiquent les potentiels rédox des réactions à pH 7.0. Figure modifiée à partir de Imlay, 2003.

Les plantes sont apparues sur Terre il y a 500 millions d'années. Ces organismes photosynthétiques sont photoautotrophes c'est-à-dire qu'ils sont capables d'utiliser la lumière comme source d'énergie, le CO₂ comme source de carbone et l'eau. Cela conduit à la production de molécules carbonées qui sont une source d'énergie ainsi que d'O₂ et d'eau. C'est l'accumulation de cet O₂ dans l'atmosphère qui serait à l'origine de la couche d'ozone protégeant la Terre des rayonnements solaires mais aussi de la création d'un environnement aérobic propice au développement de la vie.

Les espèces réactives de l'oxygène, communément appelées ROS pour Reactive Oxygen Species, sont un ensemble de molécules générées par des réductions partielles de l'oxygène moléculaire (O₂). La production de ROS est une conséquence inévitable de la vie en condition aérobic. Ils sont formés en continu dans les cellules. Il a été montré qu'ils causent des dommages au niveau cellulaire mais qu'ils sont également impliqués dans des voies de signalisation d'adaptation à des stress, de défense au pathogènes et de développement.

Le rôle des ROS sera exposé dans l'introduction de ce travail. Une première partie exposera les différents ROS produits par réduction de l'O₂. La deuxième partie portera sur leur production au niveau des chaînes de transfert d'électrons des chloroplastes et des mitochondries mais aussi des voies de production non enzymatiques et des enzymes spécialisées dans leur formation dans différents compartiments cellulaires. La troisième partie porte sur la détoxification des ROS qui est nécessaire afin d'éviter les dommages qu'ils peuvent causer. La quatrième partie concerne le rôle des ROS dans la croissance cellulaire et la cinquième partie leur rôle sur la qualité des semences. L'introduction se terminera sur les objectifs de la thèse.

1.1 Qu'est ce qu'un ROS ?

L'oxygène peut être réduit successivement pour former les différents ROS indiqués en figure 1. L'oxygène dans son état fondamental triplet (³O₂) est d'abord réduit en anion superoxyde (O₂⁻). Celui-ci va recevoir un électron et deux protons pour former le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le H₂O₂ est réduit en présence de Fe(II) ou Cu(I) en radical hydroxyl (HO[•]) qui va enfin être réduit en eau. Les potentiels rédox (figure 1) indiquent que les ROS

Tableau I : Temps de demi-vie et mobilité des ROS d'après Karuppanapandian et al., 2011.

ROS	Temps de demi-vie	Mobilité
$O_2^{\cdot-}$	1 μ s	30 nm
H_2O_2	1 ms	1 μ m
HO^{\cdot}	1 ns	1 nm

ayant le plus tendance à accepter des électrons sont dans l'ordre croissant : H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ et HO^{\cdot} . Le tableau I indique les temps de demi-vie et la mobilité de chacun de ces ROS. Le $\text{O}_2^{\cdot-}$ a un temps de demi-vie de 1 μs et une mobilité de 30 nm, ces valeurs sont intermédiaires par rapport au H_2O_2 et au HO^{\cdot} . Le H_2O_2 a le temps de demi-vie le plus long, 1 ms et la mobilité la plus importante à 1 μm . Il peut traverser les membranes au niveau des aquaporines (review : Bienert et Chaumont 2014) et agir à distance de son site de production. Le radical HO^{\cdot} a le temps de demi-vie le plus court (1 ns) et la mobilité la plus faible (1 nm). En prenant également en compte les potentiels rédox de la figure 1, le radical HO^{\cdot} est le radical de plus réactif.

Les ROS ont longtemps été considérés comme des molécules ayant des effets uniquement délétères. En effet, lors d'un stress ils sont produits en grande quantité et peuvent induire des dommages oxydatifs dans les cellules capable de mener jusqu'à la mort cellulaire. Leurs effets les plus connus sont la carbonylation des protéines, l'oxydation des clusters fer-soufre des protéines, la peroxydation des lipides et l'oxydation des acides nucléiques (review : Imlay, 2003).

Il est aujourd'hui connu que les ROS jouent un rôle essentiel dans la signalisation, l'induction de gènes, le développement des plantes et dans les réponses d'adaptation à l'environnement (review : Baxter *et al.*, 2014, Considine et Foyer, 2014)

1.2 La production de ROS dans les plantes

La production de ROS dans les cellules végétales a lieu dans différents compartiments de deux façons différentes. Tout d'abord, la production peut avoir lieu au niveau de chaînes de transfert d'électrons dans des organites spécialisés tels que le chloroplaste et la mitochondrie. En présence d'enzymes, la production peut avoir lieu dans des organites (le péroxisome et le réticulum endoplasmique) mais aussi dans la paroi et la membrane plasmique.

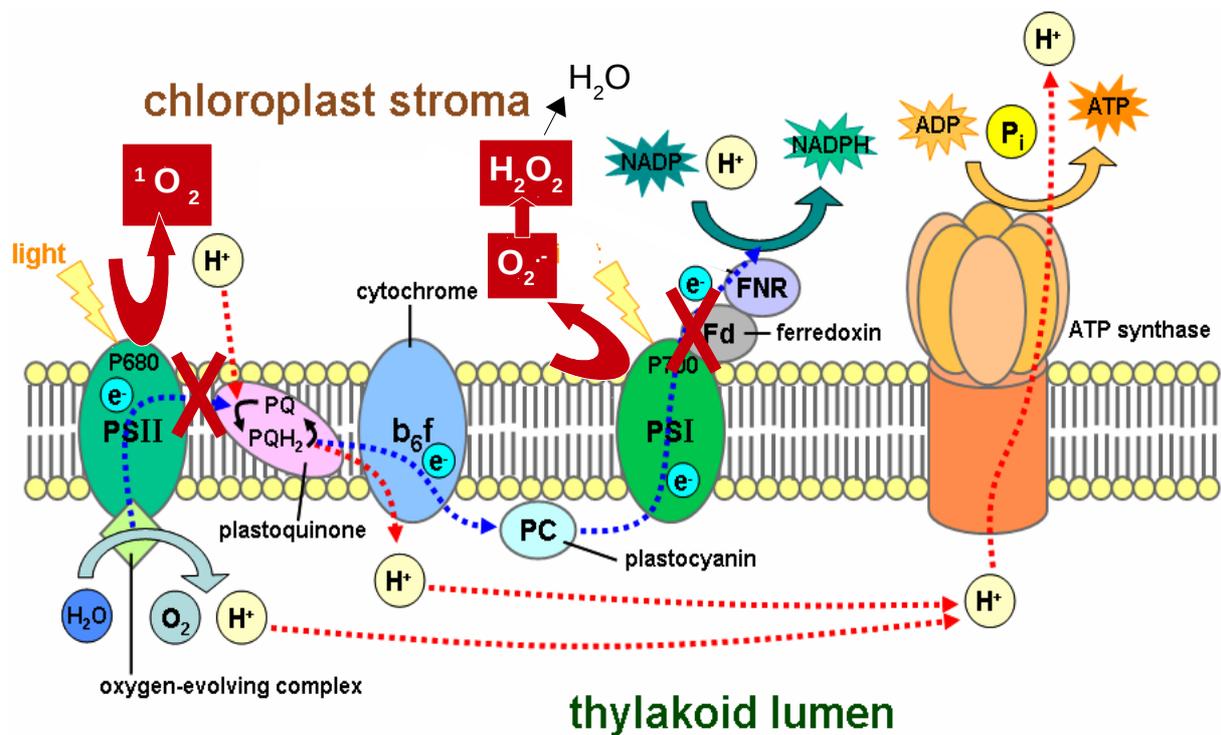


Figure 2 : Production de ROS lors du transfert d'électrons à la membrane des thylakoïdes des chloroplastes. Les photosystèmes (PS) I et II captent les photons. L'Oxygen evolving complex est le siège de la dissociation de l'eau donnant l' O_2 . PQ/PQH₂ désigne le pool de plastoquinone oxydé/ réduit. Lors d'un fort stress lumineux, le pool reste réduit et bloque le transfert d'électrons ce qui conduit par un processus complexe à la formation de 1O_2 . Au niveau du PS I, l'électron surnuméraire permet la réduction de l'oxygène en $O_2^{\cdot-}$ ensuite dismuté en H_2O_2 et en eau par l'ascorbate. L'ATP synthase permet de synthétiser de l'ATP grâce au gradient de proton généré.

1.2.1 Les chaînes de transport d'électrons

1.2.1.1 Les chloroplastes

Les chloroplastes sont des organites spécialisés dans la photosynthèse. La photosynthèse est le processus énergétique qui permet aux plantes de synthétiser leur matière organique à partir d'énergie lumineuse, de CO₂ et d'eau. La lumière est capturée par des antennes collectrices de lumière (composées de pigments : chlorophylles et caroténoïdes) situées dans la membrane des thylakoïdes. Les antennes collectrices font partie de complexes protéiques appelés photosystèmes (PS). Il en existe deux (PS I et PS II) et ils fonctionnent en série au sein d'une chaîne de transfert d'électrons (figure 2). Une fois les photons capturés par les chlorophylles du PS II, il va y avoir une séparation de charge permettant l'oxydation de l'eau en O₂. Les électrons sont ensuite transportés *via* un pool de quinones, le cytochrome b6f et la plastocyanine avant d'atteindre le PS I. En fin de chaîne, les électrons sont utilisés par la Ferrédoxine-NADP⁺ réductase pour réduire le NADP⁺ en NADPH, créant ainsi du pouvoir réducteur. En parallèle un gradient de protons est créé à partir des protons émis lors de la dissociation de l'eau et des réactions d'oxydo-réduction des quinones au niveau du PSII et du cyt b6f. Il va permettre la formation d'énergie sous forme d'ATP par la force proton-motrice de l'ATP synthase.

Lors de stress lumineux, l'énergie en excès peut être dissipée sous forme de chaleur ou de fluorescence. Lorsque ces systèmes de protection sont dépassés, le pool de plastoquinone reste réduit et le PS II n'a plus d'accepteur d'électrons, le transfert au sein de la chaîne est interrompu (Apel et Hirt, 2004). Si l'état triplet de la chlorophylle (³Chl) est créé, il peut être quenché par les caroténoïdes voisins ou réagir avec l'³O₂ pour donner l'oxygène singulet (¹O₂) qui est un ROS. Le chloroplaste est la source primaire de ¹O₂ dans les cellules végétales.

Au sein du PS I, la production de ROS peut également avoir lieu dans des conditions de saturation du cycle de Calvin situé en aval de la chaîne. La réaction de Mehler consiste en une réduction de l'O₂ en O₂⁻ par le PSI, suivie par une dismutation du H₂O₂ qui a lieu naturellement mais peut aussi être catalysée par la superoxyde dismutase et enfin la régénération de l'eau par l'ascorbate peroxydase (Asada, 1999).

La chaîne de transfert d'électrons thylakoïdienne produit donc de l'¹O₂, du O₂⁻ et de l'H₂O₂.

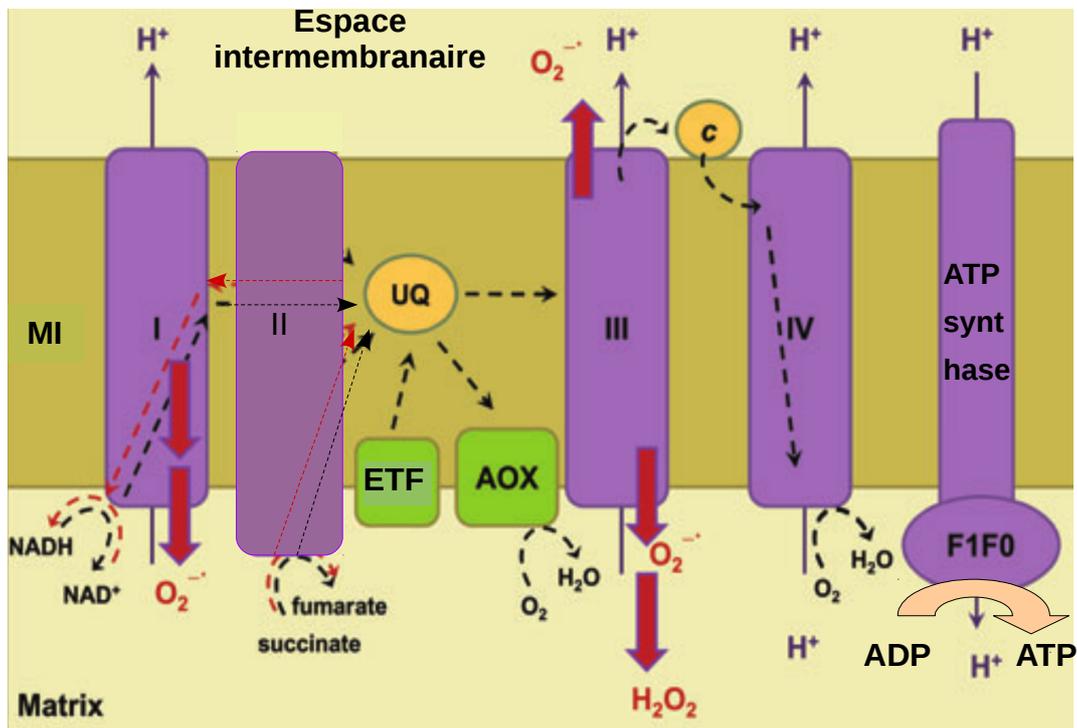


Figure 3 : Production de ROS au niveau de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale. UQ correspond au pool d'ubiquinone, ETF (electron transferring flavoprotein) à l'ETF-Q oxydoréductase, AOX à l'ascorbate peroxydase, c au cytochrome c et MI à la membrane interne mitochondriale. Les flèches noires en trait continu indique la translocation des protons à travers la membrane, les flèches en pointillés, le flux d'électrons, les flèches en pointillés rouges, le flux inverse d'électrons et les flèches rouges pleines les sites de production de l' $O_2^{\cdot-}$. Le transfert d'électrons se fait à partir du complexe I, II ou de l'ETF-Q oxydoréductase via le pool d'ubiquinone, les complexes III et IV ou l'AOX jusqu'à réduire une molécule d' O_2 en eau. Le gradient de proton formé permet la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. Figure modifiée à partir de Blokhina *et al.*, 2010.

L' H_2O_2 est le seul ROS capable de traverser l'enveloppe des chloroplastes grâce à des aquaporines de type TIP et PIP2 (Maurel *et al.*, 2015). Il peut également traverser les enveloppes par diffusion passive (Bienert *et al.*, 2006) mais la diffusion est moins efficace qu'avec des canaux de type aquaporine.

1.2.1.2 Les mitochondries

La respiration cellulaire a lieu dans les mitochondries. Elle permet la phosphorylation active de l'ADP en ATP grâce à l'oxydation de coenzymes (NADH et $FADH_2$) par l' O_2 . Quatre complexes protéiques intégrés à la membrane mitochondriale interne forment une chaîne de transfert d'électrons (figure 3). Il existe trois voies possibles d'entrées des électrons : par la NADH-Coenzyme Q oxydoréductase (complexe I) qui oxyde le NADH en NAD^+ , par la succinate déshydrogénase (complexe II) qui catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et par l'ETF-Q oxydoréductase (ETF pour electron transferring flavoprotein) qui réduit directement l'ubiquinone. Les électrons sont transférés à une ubiquinone réduite en ubiquinol puis à une Q-cytochrome c oxydoréductase (complexe III), au cytochrome c et enfin à la cytochrome c oxydase (complexe IV) ou à l'alternative oxydase (AOX) qui réduisent l' O_2 en eau. Des protons sont transportés au niveau de chaque complexe dans l'espace intermembranaire. Cela crée la force proton-motrice nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase.

Une fuite d'électrons est possible au niveau des complexes I et III, ce qui engendre la réduction de l' O_2 en $O_2^{\cdot-}$ (Blokhina *et al.*, 2010). Le $O_2^{\cdot-}$ peut ensuite être dismuté naturellement en H_2O_2 et O_2 mais peut aussi être éliminé par la superoxyde dismutase. L'AOX agit comme une alternative à la production de $O_2^{\cdot-}$ en utilisant les électrons surnuméraires pour réduire l' O_2 en eau. La chaîne de transfert d'électrons mitochondriale produit donc du $O_2^{\cdot-}$ et de l' H_2O_2 . Il a été cependant montré que chez les plantes, cette voie de production de ROS est minoritaire (Purvis, 1997). A ce jour, aucune aquaporine n'a été trouvée au niveau des enveloppes mitochondriales (Maurel *et al.*, 2015), le H_2O_2 est cependant capable de diffuser passivement à travers les membranes.

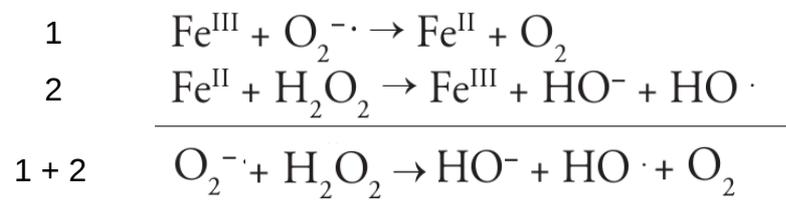


Figure 4 : La réaction de Fenton (2) additionnée à la réaction (1) donne la réaction de Haber-Weiss (1+2).

1.2.1.3 Les réactions de Fenton et de Haber-Weiss

Les réactions de Fenton et de Haber-Weiss permettent la production du radical HO· en présence de H₂O₂, de O₂⁻ et d'un métal de transition possédant des électrons non appariés tel que Fe ou Cu. Les réactions sont montrées sur la figure 4. La réaction 1 consiste en une réduction du Fe³⁺ par le O₂⁻. La réaction de Fenton (2) permet, en présence de H₂O₂ et de Fe²⁺, de produire le radical HO· ainsi que des ions Fe³⁺ et de l'OH⁻. La combinaison de ces deux réactions constitue la réaction de Haber-Weiss catalysée par le Fe.

1.2.2 Les voies de production enzymatiques

1.2.2.1 Dans les organites

1.2.2.1.1 Le péroxysome

Le péroxysome est spécialisé dans la β-oxydation des acides gras à longue chaîne et branchés. Il est aussi le troisième organite connu à synthétiser des ROS. Dans le chloroplaste, lorsque le stress lumineux est intense et que le CO₂ est limitant, les électrons surnuméraires peuvent être évacués vers le péroxysome. La ribulose 1,5- bisphosphate (Rubisco) va favoriser son activité d'oxygénation à savoir la formation de 2-phosphoglycolate et de 3-phospho-D-glycérate à partir d'O₂ et de D-Ribulose-1,5-bisphosphate. Le glycolate est ensuite transloqué vers le péroxysome. Son oxydation est catalysée par la glycolate oxydase et génère du glyoxylate et du H₂O₂ (Apel et Hirt, 2004). La seconde source de H₂O₂ péroxisomal est générée par le cycle de β-oxydation. C'est l'acyl coenzyme A oxydase, une flavoprotéine, qui réduit l'O₂ directement en H₂O₂ (Karuppanapandian *et al.*, 2011). La membrane étant perméable au H₂O₂, ce ROS va être capable de la traverser pour rejoindre le cytosol. Le péroxysome est considéré par certains chercheurs comme étant la source principale de H₂O₂ dans la cellule végétale (del Rio *et al.*, 2006).

Le péroxysome est également capable de produire du O₂⁻. La xanthine oxydase (XOD) est une enzyme de la matrice catalysant l'oxydation de la xanthine ou d'hypoxanthine en acide urique et O₂⁻ (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Le péroxysome contient également sa propre chaîne de transfert d'électrons membranaire composée d'une flavoprotéine NADH

reductase et d'un cytochrome b. L'oxygène est utilisée comme accepteur d'électrons pour générer du superoxyde qui est ensuite relâché dans le cytosol.

Ainsi, le péroxysome est capable de générer du H_2O_2 et du $O_2^{\cdot-}$ grâce à différentes voies métaboliques.

1.2.2.1.2 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le dernier organite connu synthétisant des ROS. Le cytochrome P450 appartient à une chaîne de transfert d'électrons membranaire du RE. Le cytochrome est tout d'abord réduit par une flavoprotéine avant de réagir avec de l' 3O_2 pour former du $O_2^{\cdot-}$ (Das et Roychoudhury, 2014).

La cellule végétale possède une membrane plasmique entourée d'une paroi pectocellulosique. L'espace entre la membrane et la paroi est appelé apoplaste. La membrane est une barrière dynamique entre le cytosol et l'environnement. Elle contrôle le passage d'ions, participe à de nombreuses cascades de signalisation mises en place suite à des stimuli extérieurs et permet la synthèse de la paroi cellulaire. La paroi pectocellulosique constitue une barrière mécanique et un filtre protecteur pour la cellule végétale. Elle participe aussi à donner un port érigé aux plantes. La membrane et la paroi possèdent des enzymes synthétisant des ROS.

1.2.2.2 La membrane plasmique

La membrane plasmique possède de nombreuses enzymes qui peuvent être intrinsèques ou extrinsèques. Parmi elles, deux sont capables de produire des ROS : les NADPH oxydases et les NAD(P)H :quinone oxydoréductases.

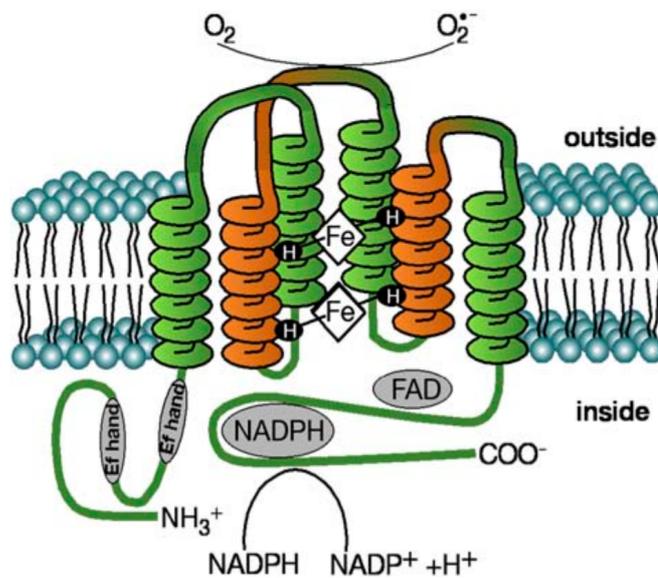


Figure 5 : Structure prédite de la NADPH oxydase d'*A.thaliana*. L'enzyme possède 6 domaines transmembranaires. Du côté C-terminal, il y a un site de liaison au NADPH ainsi qu'au FAD. Du côté N-terminal, deux motifs à main EF permettent de fixer le calcium. La réduction de l'oxygène en $O_2^{\cdot-}$ se fait du côté apoplastique. Figure provenant de Sagi and Fluhr 2006.

1.2.2.2.1 Les NADPH oxydases

Chez les plantes, les NADPH oxydases (Nox) sont codées par les gènes de la *respiratory burst oxidase homologue (Rboh)* chez des nombreuses espèces (Torres *et al.*, 1998 ; Marino *et al.*, 2012). Leur expression est détectée suite à des attaques pathogènes et ont pour conséquence un burst oxydatif, c'est-à-dire un pic de production de ROS (Torres et Dangl, 2005). Elles ont un fonctionnement similaire à leurs homologues animales, *gp91phox*, la sous-unité catalytique des phagocytes de mammifères (Sagi et Fluhr, 2006).

L'analyse de la séquence en acides aminés des NADPH oxydases végétales a permis de prédire leur structure. Elle possède jusqu'à 10 domaines transmembranaires, les domaines N-terminal et C-terminal sont cytosoliques. Selon les espèces, il y a de fortes similarités au niveau des domaines transmembranaires et du domaine C-terminal tandis que le domaine N-terminal est plus variable (Sagi et Fluhr, 2006). La protéine possède deux hèmes. En C-terminal se trouvent des sites de liaisons au FAD (flavine adénine dinucléotide) et au NADPH et en N-terminal des motifs conservés à main EF permettent de lier le Ca^{2+} . Le NADPH est le donneur d'électron cytosolique permettant la réduction apoplastique de l' O_2 en O_2^- via le cofacteur FAD et deux hèmes. Le O_2^- est alors dismuté en H_2O_2 de façon non enzymatique ou à l'aide de la SOD. La structure de la NADPH oxydase d'*A.thaliana* est présentée en figure 5, et contient 6 domaines transmembranaires (Torres *et al.*, 1998).

Les gènes *Rboh* appartiennent à une petite famille multigénique comprenant 10 membres chez *Arabidopsis thaliana* (*Atrboh A-J*), 9 membres chez le riz et au moins 4 chez le maïs (Luthje *et al.*, 2013).

De nombreuses études ont permis de déterminer que les NADPH oxydases des plantes ont des rôles physiologiques variés tels que la fermeture des stomates, la croissance des poils racinaires et les réponses de défense aux attaques pathogènes (Marino *et al.*, 2012). Chez *A.thaliana*, les différentes isoformes de NADPH oxydase sont exprimées de façon tissu-spécifique : dans la plante entière pour *AtrbohD* et *F*, dans les racines pour *Atrboh A-G* et *I* et dans les grains de pollen pour *Atrboh H* et *J* (Sagi et Fluhr, 2006). De plus, chaque isoforme semble avoir des rôles différents.

Au niveau des graines, les mutants *rbohB* et *rbohD* montrent tous deux une germination plus faible que le sauvage (Muller *et al.*, 2009 et Leymarie *et al.*, 2012). Les mécanismes d'action sont mal connus mais il semblerait que les isoformes B et D de la

NADPH oxydase aient un rôle important dans la germination. Les NADPH oxydases jouent aussi un rôle dans la croissance des racines et de l'hypocotyle (Foreman *et al.*, 2003 ; Renew *et al.*, 2005 ; Heyno *et al.*, 2011). Foreman *et al.*, (2003) ont montré que des mutants *rhd2*, KO pour la *rbohC*, ont des poils racinaires rabougris et très courts. Cette observation est corrélée à une absence de gradient de concentration de Ca^{2+} à l'extrémité du poil racinaire ainsi qu'à une absence de flux d'ions Ca^{2+} à travers les canaux. Le phénotype est partiellement sauvé grâce à une application exogène de $HO\cdot$. Il semblerait donc que *rbohC* soit nécessaire à la croissance des poils racinaires et que ce soit les ROS produits par cette enzyme qui permettraient le bon fonctionnement des canaux calciques et l'établissement du gradient Ca^{2+} dans les cellules. Une étude de Torres *et al.*, (2002) décrit l'effet de mutations perte de fonction de *rbohD* et *rbohF* sur l'infection à des pathogènes (*Pseudomonas syringae* et *Peronospora parasitica*). Les deux mutants montrent une diminution de l'accumulation de ROS, une réduction de la mort cellulaire, une diminution de la fuite d'électrolytes. Il semblerait que les isoformes D et F de la NADPH oxydases jouent un rôle important dans l'activation des défenses de la plante *via* l'accumulation de ROS. Ces deux isoformes joueraient aussi un rôle dans la fermeture des stomates d'après Kwak *et al.*, (2003). Leur mécanisme d'action serait médié par l'activation de canaux calciques par l'acide abscissique (ABA).

La double mutation de *rbohH* et *rbohJ* semble affecter la croissance du tube pollinique de façon semblable (Kaya *et al.*, 2014). Les mutants montrent une diminution de la croissance tube, une réduction de la production de ROS médiée par le calcium et une diminution de l'activité de phosphatases. La production de ROS des NADPH oxydases semble être activée de façon synergique par la phosphorylation et la liaison de calcium sur les mains EF. De plus, de récentes études montrent que les NADPH oxydases seraient régulées par les GTPases, le calcium et la phosphorylation par plusieurs familles de protéines kinases telles que les calcium-dependent/calmodulin-like domain protein kinases (CDPK) (Karkonen *et al.*, 2014).

1.2.2.2.2 Les NAD(P)H :quinone oxydoréductases

Les NAD(P)H :quinone oxydoréductases, appelées aussi quinones réductases (QR), sont des enzymes catalysant la réduction de quinones en dihydroquinones. Elles sont

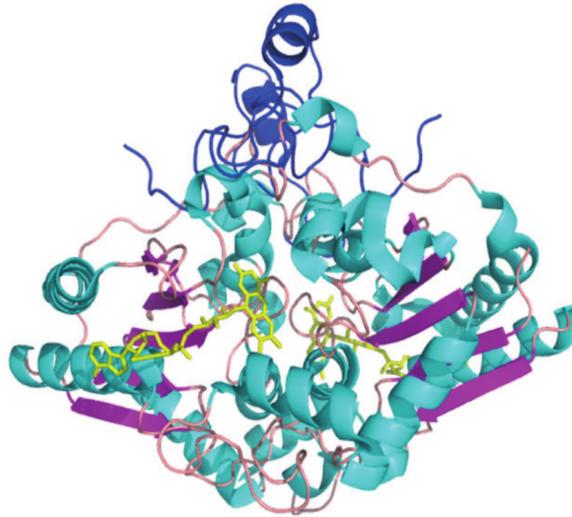


Figure 6 : Structure de NQO1, une NAD(P)H :quinone oxydoréductase humaine. La protéine est organisée en dimère. Les hélices α sont en bleu, les feuillets β en violet. Les cofacteurs FAD sont en jaune. Figure provenant de Deller *et al.*, 2008.

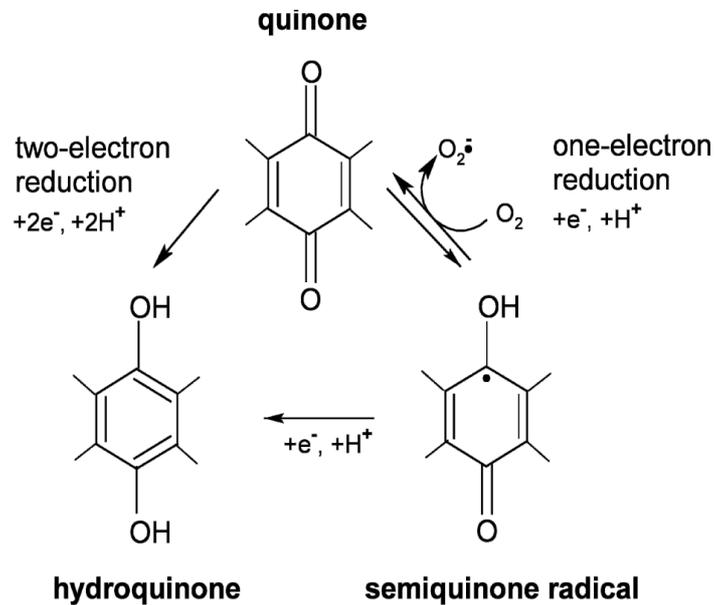


Figure 7 : Mécanisme de réduction des quinones. La quinone est réduite par transfert d'un électron pour former le radical semiquinone et par deux électrons pour former la dihydroquinone.

retrouvées chez les bactéries, les champignons, les animaux et les plantes (Heyno *et al.*, 2013). Elles possèdent souvent des structures et des substrats proches mais peu d'homologies de séquences. Ces enzymes ont pour donneur d'électrons le NADH et/ou le NADPH et possèdent un cofacteur flavine. Elles ont été découvertes chez les animaux par Ernster et Navazio en 1958 (Ernster et Navazio, 1958) et sont depuis étudiées pour leur effet antioxydant.

Chez les animaux les NAD(P)H : quinone oxydoréductases sont regroupées au sein d'une même famille, les DT-diaphorases. La structure de NQO1, une DT-diaphorase humaine est présentée en figure 6. Sa structure est semblable à celle d'une flavodoxine, à savoir des feuilletts β parallèles situés au centre de la protéine et entourés par des hélices α . NQO1 possède un cofacteur FAD fixé non covalamment et s'organise sous forme de dimère (Deller *et al.*, 2008). Les QR fongiques et bactériennes partagent ces caractéristiques mais leur état d'oligomérisation peut être différent. Si les QR sont souvent trouvées dans les fractions cellulaires solubles, elles ont aussi une affinité pour la membrane (Carey *et al.*, 2007 ; Jonas *et al.*, 2006).

Les DT-diaphorases catalysent la réduction de quinones de type vitamine K par transfert obligatoire de deux électrons en utilisant indépendamment le NADH ou le NADPH comme donneur d'électrons (Ernster, 1967). Cette réaction conduit à la formation de dihydroquinones qui sont très stables. Elle entre en compétition avec d'autres réactions formant des semiquinones (comme la NADPH-cytochrome P450 réductase, Lind *et al.*, 1982), c'est-à-dire des quinones radicalaires (figure 7). Les semiquinones sont capables de céder leur électron surnuméraire à des molécules comme l'oxygène et de former du $O_2^{\cdot-}$. En entrant en compétition avec ces réactions productrices de ROS, les DT-diaphorases sont considérées comme étant anti-oxydantes (Dinkova-Kostova *et al.*, 2000). De plus, Siegel *et al.*, (2004) ont montré que NQO1 a une activité de scavenger de $O_2^{\cdot-}$. Elle aurait aussi la capacité de se fixer au suppresseur de tumeur p53 et ainsi de le stabiliser pour empêcher sa dégradation par le protéasome (Dinkova-Kostova *et al.*, 2010).

Chez les plantes, des QR ont été isolés à partir de fractions cytosoliques ou membranaires dans différentes espèces telles que le maïs (Luster et Buckhout, 1989), le tabac (Sparla *et al.*, 1996), la betterave (Trost *et al.*, 1996), la courgette (Trost *et al.*, 1997), l'hévéa (Chareonthiphakorn *et al.*, 2002) ou encore le soja (Schopfer *et al.*, 2008). Ces QR font une vingtaine de kilodaltons et sont souvent sous forme tétramérique (Deller *et al.*, 2008). Le

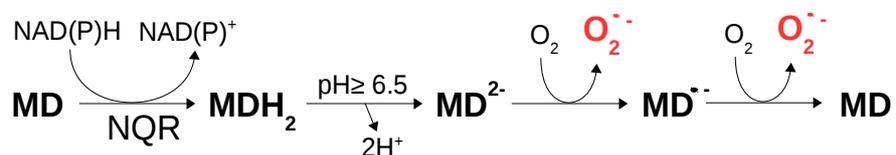


Figure 8 : Réaction catalysée par NQR et formation de superoxyde. La ménadione (MD) est réduite par la NQR en dihydroménadione (MDH₂) en utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électrons. A pH supérieur ou égal à 6.5, la MDH₂ est déprotonnée en MD²⁻. Puis MD²⁻ s'autooxyde en semiménadione (MD^{·-}) par réduction de l'O₂ en O₂^{·-}. Enfin, MD^{·-} s'autooxyde en MD par réduction de l'O₂ en O₂^{·-}. Figure issue de Schopfer *et al.*, 2008.

cofacteur des QR végétales identifiées est le FMN (flavine mononucléotide) et le donneur d'électrons le NAD(P)H.

Le potentiel rédox des QR ainsi que leur substrat quinone naturel sont inconnus à ce jour. Cependant, les quinones étant souvent des molécules hydrophobes, elles ne peuvent pas se trouver dans le cytosol. Il est possible que les quinones se trouvent au niveau de la membrane plasmique et que la vitamine K1 (phylloquinone, 2-Methyl,3-phythyl-naphtoquinone) remplisse ce rôle (Luthje, 2008). Cependant, les QR ne possèdent pas de domaines transmembranaires ou de modifications pouvant justifier de leur liaison à la membrane plasmique.

Schopfer *et al.*, (2008) ont observé que l'activité de fractions de membrane plasmique d'hypocotyle de soja augmente d'un facteur 100 après l'ajout de ménadione, qui est une 1, 4-naphtoquinone. Une enzyme identifiée comme étant une NAD(P)H : quinone oxydoréductase (NQR) a pu être isolée à partir de membranes plasmiques. Elle est capable de réduire une multitude de quinones grâce à l'oxydation de NADH ou de NADPH. A pH 7.5 en utilisant la ménadione comme substrat, l'activité enzymatique conduit à une accumulation de dihydroménadione. A partir du pH 6.5 et des pH plus alcalins, dans les mêmes conditions par ailleurs, la formation de superoxyde, de dihydroménadione (MDH_2) capable de s'autooxyder en semiménadione ($\text{MD}^{\cdot-}$) ainsi qu'une consommation d'oxygène sont observés. Le modèle de la réaction proposée est représenté sur la figure 8. La ménadione (MD) est réduite par la NQR en dihydroménadione (MDH_2) en utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électrons. A pH supérieur ou égal à 6.5 c'est-à-dire à pH alcalin, la MDH_2 est déprotonnée en MD^{2-} . Puis MD^{2-} s'autooxyde en semiménadione ($\text{MD}^{\cdot-}$) par réduction de l'oxygène en $\text{O}_2^{\cdot-}$. Afin de revenir à l'état stable de ménadione, $\text{MD}^{\cdot-}$ s'autooxyde par réduction de l'oxygène en $\text{O}_2^{\cdot-}$. Cette étude met en évidence une production indirecte de superoxyde par la NQR qui est consécutive à la déprotonation de MDH_2 . Cette réaction souligne le rôle ambivalent de NQR qui a un rôle antioxydant semblable aux DT-diaphorases animales tout en permettant la formation de superoxyde à pH alcalin.

Chez *A.thaliana* il existe 5 gènes codant des QR : NQR (NAD(P)H : quinone réductase) et FQR1 à FQR4 (flavodoxin-like quinone réductase). Sparla *et al.*, (1999) ont pu exprimer la protéine NQR d'*A.thaliana* chez la bactérie *E.coli*. La protéine NQR recombinante est réductible, contient un cofacteur FMN et peut catalyser l'oxydation du NADH et du NADPH en présence d'une duroquinone. Le poids moléculaire estimé de NQR

est de 21.5 kDa. De façon semblable à NQR, *AtFqr1* a été exprimé dans *E.coli* (Laskowski *et al.*, 2002). Le FMN est aussi son cofacteur, FQR1 est réductible et peut utiliser la ménadione comme substrat. L'addition d'auxine à des cultures de racines de plantes sauvages a permis d'observer une accumulation très rapide d'ARN messagers de FQR1. L'accumulation commence dès 10 minutes de traitement et devient 10 fois plus importante que celle des plantes contrôle non traitées au bout de 30 minutes. FQR1 semble être un gène primaire de réponse à l'auxine (Laskowski *et al.*, 2002). Son poids moléculaire estimé est de 21.7 kDa.

Quelques études portent sur les QR végétales et permettent de spéculer sur leur fonction. Greenshields *et al.*, (2005) ont étudié deux QR dans des feuilles de blé subissant une infection au mildiou. QR2 réduit les quinones par transfert de deux électrons en formant des dihydroquinones et QR1 transfère 1 électron et forme des semiquinones, ce qui engendre la production de O_2^- . L'expression de QR1 est réprimée lors de l'infection tandis que celle de QR2 est induite. Dans le cas d'une attaque pathogène, un burst oxydatif est induit, une hypothèse concernant ce travail est que QR1 qui est pro-oxydante est réprimée pour limiter le stress oxydant, au contraire QR2 serait induite pour détoxifier les ROS. Dans cette étude, le rôle ambivalent des QR est retrouvé au niveau de deux protéines distinctes. Les QR pourraient servir à créer un environnement rédox défavorable à l'infection de la plante.

Une seconde étude a été faite sur l'effet d'un stress biotique sur les QR. Des lignées pertes de fonctions des gènes NQR et FQR1 ainsi qu'une lignée surexprimant FQR1 d'*A.thaliana* ont été utilisées par Heyno *et al.*, (2013). Suite à l'infection à deux champignons, *B.cinerea* et *S.sclerotium*, les plantes sauvages montrent une accumulation de protéines NQR et FQR1. Les mutants KO *nqr* et *fqr1* montrent un développement réduit des lésions, une germination conidiale des champignons accrue et une augmentation de la production de ROS dans les feuilles d'Arabidopsis. Le mutant surexpresser FQR1+ présente quant à lui une hypersensibilité à l'infection car le développement des lésions est plus important que chez le sauvage. L'hypothèse proposée par les auteurs est que les mutants QR sont capables d'altérer l'état rédox afin de perturber l'infection des pathogènes et les réponses de la plante qui y sont associées.

Au niveau des stress abiotiques, le stress salin semble induire l'expression des QR. Le stress salin induit une augmentation de l'abondance d'une 1,4-benzoquinone reductase chez le riz (Cheng *et al.*, 2009) et chez la tomate (Manaa *et al.*, 2011). Song *et al.*, (2016) ont transformé *E.coli* avec l'unique SmQR provenant de *Salix matsudana* une plante ayant une

tolérance à la salinité. Une lignée d'*A.thaliana* surexprimant ce même gène a été construite. Dans les deux cas, la SmQR permet d'augmenter la tolérance au stress salin induit par l'application de 800 mM NaCl pour *E.coli* et 200 mM pour *A.thaliana*. Chez les plantes stressées, la surexpression de SmQR induit une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes (la superoxyde dismutase et la peroxydase), une diminution de la peroxydation des lipides, une diminution de la perméabilité des membranes ainsi qu'une diminution de la production de ROS. L'ensemble de ces résultats suggèrent que SmQR pourrait avoir un rôle protecteur anti-oxydant lors du stress salin et permettre d'accroître la tolérance au sel.

Toutes ces études ne permettent pas de déterminer clairement le rôle des QR dans les plantes, d'autant plus qu'il semble que son rôle soit différent selon la nature des stress. Cependant, les QR semblent jouer sur l'état rédox des plantes.

Des hypothèses concernant le fonctionnement des QR au niveau de la membrane plasmique ont été faites (Berczi et Moller, 2000 ; Luthje *et al.*, 2013). Selon des prédictions *in silico*, des protéines de la membrane pourraient s'agréger au niveau de rafts lipidiques pour permettre un transfert local d'électrons à travers la membrane plasmique en réponse à des stimuli environnementaux. Trois QR ont justement été trouvées au niveau de rafts lipidiques : FQR1, une 1,4-Benzoquinone reductase-like ainsi que des membres de la famille des QR (Borner *et al.*, 2005 ; Morel *et al.*, 2006 ; Kieszeniowska *et al.*, 2009 ; Lefebvre *et al.*, 2007). Des QR pourraient donc échanger des électrons à travers la membrane *via* la vitamine K1 jusqu'à des partenaires réductibles par cette quinone comme par exemple des cytochromes b 561 également présents au niveau des rafts.

1.2.2.3 La paroi cellulaire

La paroi cellulaire se trouve à l'extérieur de la cellule végétale. Elle permet d'apporter une certaine résistance aux cellules végétales ainsi qu'une protection mécanique et participe au port érigé de la plante. Elle forme une barrière sélective supplémentaire par rapport à la membrane plasmique. La paroi cellulaire est organisée en sandwich : la lamelle moyenne est entourée de part et d'autre par la paroi primaire sur laquelle peut se déposer la paroi secondaire. La lamelle moyenne est composée de pectine et sert de base pour le dépôt de la paroi primaire et secondaire. La paroi primaire est composée de 25-30 % de microfibrilles de

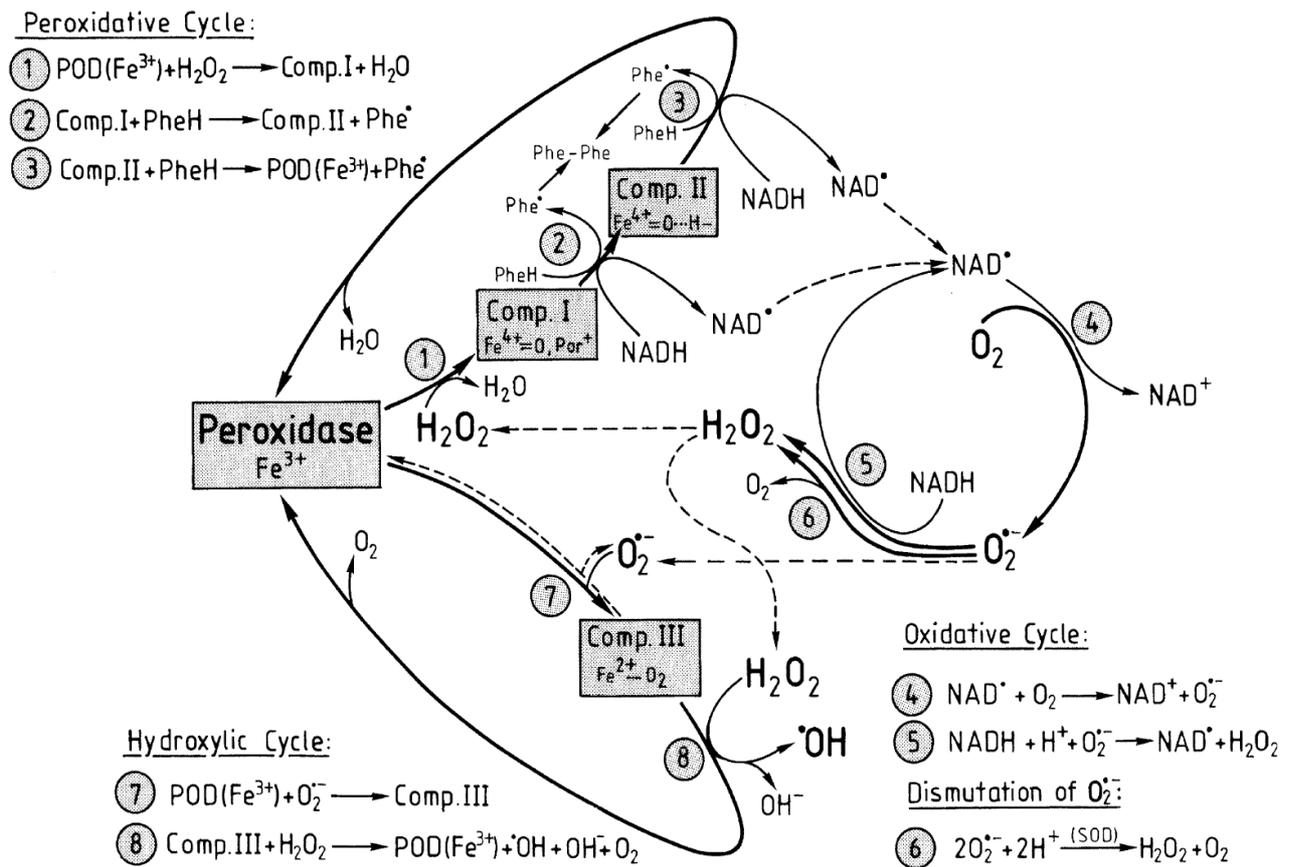


Figure 9: Schéma des cycles catalytiques des peroxydases de classe III pariétales. Comp I-III signifie composé I-III, Phe composé phénolique. Les réactions sont expliquées dans le texte. Figure issue de Liskay *et al.*, 2003.

cellulose et de 30-65 % d'hémicellulose arrangées pour former une armature, 5-35 % de pectines servant de ciment, 0.5-5 % de protéines et d'eau. La paroi secondaire est plus rigide et se situe du côté de la membrane plasmique. Elle se compose de 35-50 % de cellulose, 20-35 % d'hémicellulose et de 10-25 % de lignine et contient moins d'eau que la paroi primaire. La paroi contient 3 types d'enzymes essentielles à la croissance cellulaire et synthétisant des ROS : les peroxydases, les amines oxydases et les oxalates oxydases.

1.2.2.3.1 Les peroxydases de classe III

Les peroxydases de classe III sont des enzymes spécifiques aux plantes. Elles sont principalement ancrées au niveau de la paroi cellulaire et de la membrane plasmique toujours tournées vers l'apoplaste (Karkonen *et al.*, 2014). Elles possèdent un hème. Elles sont capables de réaliser trois types de cycles catalytiques (figure 9 ; Liskay *et al.*, 2003). Dans le cycle peroxydatif, l' H_2O_2 est utilisé comme oxydant dans une réaction en deux étapes convertissant un composé phénolique en radical phénoxy (Phe^\cdot) (équations 1-3). Ces radicaux peuvent ensuite s'associer de façon spontanée pour former des polymères tels que la lignine au niveau de la paroi. La lignine va avoir pour effet de rigidifier la paroi et ainsi d'inhiber la croissance cellulaire. Dans le cycle oxydatif, le NADH peut remplacer les composés phénoliques du cycle peroxydatif ce qui entraîne la formation d'un radical NAD $^\cdot$ (équation 4). Le radical NAD $^\cdot$ peut réduire l'oxygène en O_2^\cdot qui pourra à son tour être converti en H_2O_2 grâce à l'oxydation du NADH en NAD $^\cdot$ (équation 5). Le H_2O_2 peut être dimuté spontanément pour former du O_2^\cdot ou bien grâce à la SOD (équation 6). Dans le cycle hydroxylique, la peroxydase sous forme ferrique (Fe^{3+}) peut être réduite par le O_2^\cdot pour donner le composé III (équation 7). Ce composé peut réduire le H_2O_2 en HO^\cdot grâce à une réaction de type Fenton (équation 8). De cette façon la peroxydase peut produire de HO^\cdot en présence d'une source de O_2^\cdot et H_2O_2 . Les peroxydases peuvent donc produire des ROS tels que le O_2^\cdot et le H_2O_2 grâce au cycle oxydatif et de l' HO^\cdot au niveau du cycle hydroxylique mais aussi consommer du H_2O_2 par le cycle peroxydatif.

Schopfer *et al.*, (2001) ont montré que lors de la germination des semences de radis, il y a production de O_2^\cdot , de H_2O_2 et de HO^\cdot au niveau de l'embryon et de l'enveloppe. De plus, les enveloppes sécrètent des peroxydases en fin de phase de germination et lors du

développement précoce des plantules. Ces informations ont été étayées par Liskay *et al.*, (2003). Des coléoptyles de maïs et des hypocotyles de tournesol ont été incubés dans du NADH et de l' H_2O_2 . Un relâchement de la paroi et une croissance des segments ont été observés. Ces effets peuvent être bloqués grâce à des scavengers de $HO\cdot$ et des inhibiteurs des peroxydases, ce qui montre que le relâchement de la paroi cellulaires est bien du au $HO\cdot$ produit par les peroxydases. Des mesures de spectroscopie à Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) ont permis de déterminer que le NADH seul suffit à la production de $HO\cdot$ par les tissus. En régulant la disponibilité en H_2O_2 dans l'apoplaste et la paroi, les peroxydases joueraient un rôle de la réticulation des groupes phénoliques de la paroi. Cette réaction a lieu lors du développement de la paroi après la croissance de la cellule, lors de la différenciation des cellules, de la sénescence mais aussi suite à des attaques de pathogènes (Passardi *et al.*, 2004).

Ainsi, les peroxydases de type III seraient avec les NADPH oxydases responsables du burst de ROS au niveau de l'apoplaste suite à une infection par des pathogènes (O'Brien *et al.*, 2012). Selon Daudi *et al.*, (2012), diminuer l'expression des peroxydases PRX33 et PRX34 par une stratégie anti-sens bloquerait le burst oxydatif normalement induit suite à une infection fongique et cela provoquerait une sensibilité accrue aux pathogènes. Cet effet serait dû à une réduction de la production de ROS et du dépôt de callose au niveau de la paroi. De plus, l'expression de gènes nécessaires à la mise en place des défenses de la plante est régulée négativement.

1.2.2.3.2 Les amine oxydases

Les amine oxydases (AO) sont des enzymes catalysant la dé-amination oxydative de polyamines nécessaires à la croissance cellulaire et au développement (Angelini *et al.*, 2010). Elles sont abondantes dans l'apoplaste des Graminées et des Légumineuses et sont aussi retrouvées dans la vacuole. Lors de la dé-amination, du H_2O_2 est produit. Les AO se subdivisent en deux groupes : les AO contenant du cuivre (CuAO) et les polyamines oxydases (PAO) qui contiennent un cofacteur flavine. Leur activité dépend de l'approvisionnement en polyamines au niveau de la paroi cellulaire (Karkonen *et al.*, 2014).

Les AO seraient impliquées dans la cicatrisation des blessures, la défense aux pathogènes ainsi que dans la réponse au stress salin. Rodriguez *et al.*, (2009) ont étudié l'effet des PAO sur la zone d'élongation de feuilles de maïs suite à un stress salin. Suite au stress, il y a une accumulation de polyamines au niveau de l'apoplaste des cellules de la zone d'élongation, une forte augmentation de l'activité des PAO, en inhibant l'activité des PAO une diminution de 50 % de production de H₂O₂ est observée. En conditions de stress salin, les PAO sont responsables d'une part importante de la production de H₂O₂ dans l'apoplaste ce qui permet l'élongation des feuilles de maïs.

1.2.2.3.3 Les oxalate oxydases

Les oxalate oxydases (OXO) catalysent l'oxydation de l'oxalate en H₂O₂ et CO₂. Elles regroupent deux types d'enzymes : les germines et les germine-like proteins (GLP). Elles sont présentes au niveau de l'apoplaste mais aussi de la vacuole dans des groupes variés tels que les monocotylédones, les dicotylédones, les gymnospermes et les mousses (Davidson *et al.*, 2009). Les germines ont d'abord été détectées au début de la germination chez le blé, elles étaient considérées comme un marqueur de la germination (Lane, 1994). Les OXO sont impliquées dans la défense à des pathogènes et pourraient jouer un rôle dans la réticulation de la paroi cellulaire (Davidson *et al.*, 2009).

1.3 La détoxification des ROS

Étant donné que la production de ROS est inévitable dans un environnement riche en oxygène, les plantes ont développé des systèmes détoxifiants pour limiter les dégâts cellulaires. Une partie de ces processus se fait par des enzymes mais aussi par des molécules antioxydantes à faible poids moléculaire.

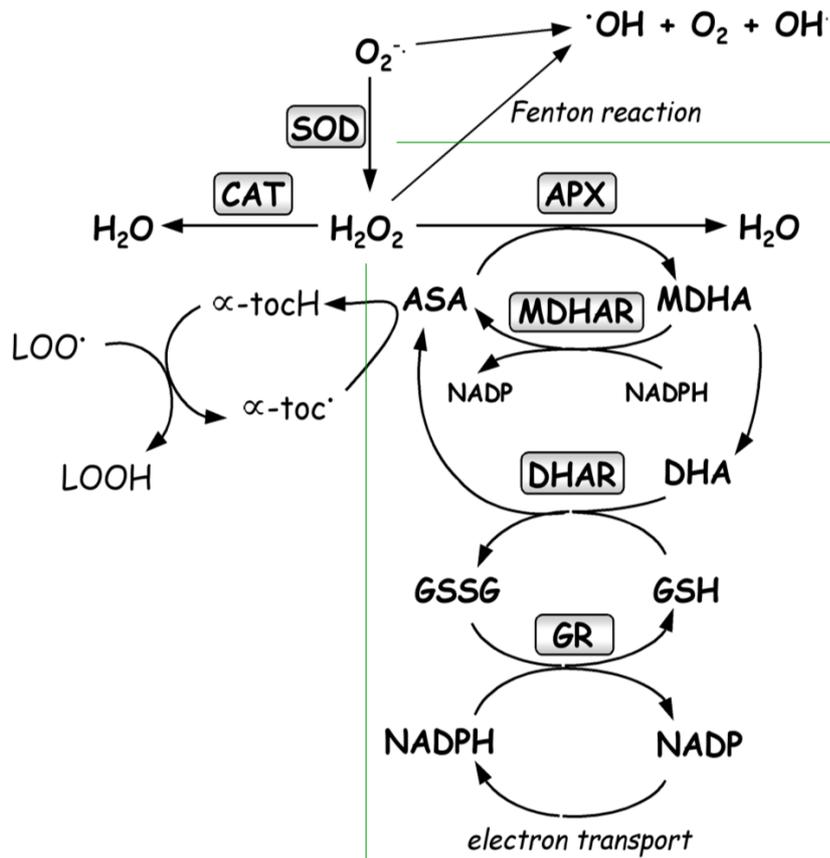


Figure 10 : Schéma des réactions antioxydantes chez les plantes. Les enzymes sont représentées par des rectangles gris. Le cycle glutathion-ascorbate est dans le cadre vert, il permet la régénération de l'ascorbate et du glutathion. CAT signifie catalase, SOD superoxyde dismutase, APX, ascorbate peroxydase, MDHAR monodéhydroascorbate réductase, DHAR déhydroascorbate réductase, GR glutathion réductase, ASA ascorbate, MDHA monodéhydroascorbate, DHA déhydroascorbate, GSSG glutathion oxydée, GSH glutathion réduit, α -tocH α -tocophérol, α -toc α -tocophéryl, LOOH peroxyde lipidique et LOO^{\cdot} radical lipidique. Figure modifiée d'après Bailly 2004.

1.3.1 Les molécules antioxydantes à faible poids moléculaire

1.3.1.1 L'ascorbate

L'ascorbate (ASA) est l'antioxydant à faible poids moléculaire le plus important dans les plantes (Noctor, 2006). L'ASA est synthétisé dans les feuilles au niveau des mitochondries. Il est ensuite transporté dans toute la cellule et notamment vers la paroi cellulaire et l'apoplaste où il est le seul antioxydant non enzymatique présent. Il est essentiel à la synthèse et à la réticulation de la paroi (Foyer et Noctor, 2009). L'ASA est le donneur d'électrons de l'ascorbate peroxydase (APX) qui est une enzyme détoxifiante (figure 10). Lors de cette réaction il est oxydé en radical monodéhydroascorbate (MDHA) qui peut régénérer l'ASA par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) qui a pour donneur d'électrons le NADH ou bien être dismuté en dihydroascorbate (DHA) et ASA. Le DHA est ensuite utilisé par la dihydroascorbate réductase (DHAR) pour régénérer l'ASA grâce au glutathion réduit (GSH). Cette régénération est possible lors du cycle glutathion-ascorbate (figure 10 cadre vert).

Son rôle indispensable au développement a été prouvé par Dowdle *et al.*, (2007). Un double mutant KO d'*A.thaliana* a été produit : il est affecté au niveau du gène VTC2 codant la GDP-L-Galactose phosphorylase, enzyme de la voie de biosynthèse de l'ASA, et d'un gène homologue VTC5. Les graines du double mutant arrêtent leur développement juste après la germination et les cotylédons restent blancs. Le phénotype est sauvé grâce à l'ajout d'ascorbate. Des faibles niveaux d'ascorbate dans les cellules sont associés à de la sénescence prématurée (Barth *et al.*, 2004) ainsi qu'une sensibilité accrue à la mort cellulaire programmée (Pavet *et al.*, 2005). De nombreuses études montrent que l'ASA joue un rôle essentiel dans le développement et les défenses aux pathogènes (Gallie, 2013). L'ASA est essentiel au fonctionnement de plusieurs protéines de l'apoplaste notamment les cytochrome b561 qu'il réduit (Asard *et al.*, 2001).

1.3.1.2 Le glutathion

Le glutathion est retrouvé sous forme réduite (GSH) dans les cellules. Lors du cycle glutathion-ascorbate, il est oxydé (GSSG) permettant la régénération de l'ASA catalysée par la DHAR. Le glutathion réduit est à son tour régénéré grâce à la glutathion réductase (GR) qui a pour donneur d'électrons le NADPH.

La voie de biosynthèse du glutathion se fait à partir de Cystéine, de Glycine et la Glutamine et commence dans les plastes pour se finir dans le cytosol (Foyer et Noctor, 2009). Il est ensuite transporté les mitochondries et les chloroplastes. Le glutathion associé à des enzymes telles que les GR ou les thiorédoxines permet de réguler l'activité de protéines par la réduction de ponts disulfures.

Des mutants KO affectés au niveau de SH1 et SH2 codant les deux enzymes synthétisant le glutathion, sont respectivement déficient dans le développement post-embryonnaire des racines (Cairns *et al.*, 2006) et incapable de germer (Pasternak *et al.*, 2008). Le glutathion est donc indispensable au développement des plantes. Il est impliqué dans les réponses aux attaques de pathogènes en modulant les voies de signalisation de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique mais aussi au niveau développemental (Rouhier *et al.*, 2015).

1.3.1.3 Le tocophérol

Le tocophérol est un antioxydant lipophile présent au niveau des membranes. Il existe sous 4 formes : α -, β -, γ -, δ - tocophérol mais c'est l' α -tocopherol qui est considéré comme le meilleur antioxydant (Das et Roychoudhury, 2014). Il est synthétisé au niveau de la membrane des thylakoïdes et accumulé dans les chloroplastes.

C'est un scavenger de $^1\text{O}_2$ au niveau du PSII. Il permet aussi d'arrêter la propagation de l'autooxydation des lipides (Hollander-Czytko *et al.*, 2005). Après avoir été oxydé par les peroxydes lipidiques (figure 10), il est recyclé sous sa forme réduite par l'ascorbate.

1.3.1.4 Les caroténoïdes, les flavonoïdes et la proline

Les caroténoïdes sont des pigments hydrophobes présents au niveau des PS de la membrane des thylakoïdes. Ils font partie des antennes collectrices de lumière et peuvent transférer l'énergie aux molécules de chlorophylle. Ils sont capables de protéger la machinerie photosynthétique en piégeant l' $^1\text{O}_2$, la Chl^3 et en dissipant l'énergie sous forme de chaleur ou *via* le cycle des xanthophylles (Das et Roychoudhury, 2014).

Les flavonoïdes sont accumulés dans les vacuoles et donnent la pigmentation des fleurs, des fruits et des semences. Ils ont un rôle dans la protection contre les UV et la défense contre les pathogènes par exemple. Ce sont aussi des scavengers de ROS (Gill et Tuteja, 2010).

La proline est connue pour son rôle d'osmolyte mais elle est aussi un fort antioxydant (Das et Roychoudhury, 2014). C'est un scavenger de HO^\cdot , $^1\text{O}_2$.

1.3.2 Les enzymes antioxydantes

1.3.2.1 La superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme catalysant la dismutation du $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 (figure 10). Cette réaction est 10000 fois plus rapide que la dismutation spontanée. Elle est ubiquitaire chez les organismes aérobies (Gill et Tuteja, 2010). C'est une métalloprotéine qui selon sa localisation s'associe à différents métaux : dans les mitochondries et les péroxysomes avec le Mn (del Rio *et al.*, 2003), dans le chloroplaste avec le Cu, le Zn ou le Fe, dans le cytosol avec le Cu ou le Zn (del Rio *et al.*, 2002). La SOD est associée en dimère dans tous les compartiments sauf dans la mitochondrie où elle se trouve sous forme tétramérique.

1.3.2.2 La catalase

La catalase (CAT) est une enzyme catalysant la dismutation de H_2O_2 directement en H_2O et O_2 (figure 10). C'est une enzyme tétramérique contenant un hème. Elle a un taux de

turnover très rapide, une molécule de CAT peut convertir 6 millions de molécules de H₂O₂ en H₂O par minute (Gill et Tuteja, 2010). Chez les Angiospermes, il existe 3 gènes codant des isoformes de la CAT (Das et Roychoudhury, 2014). CAT1 est exprimée dans les graines et le pollen au niveau des péroxysomes et du cytosol. CAT2 est surtout exprimée dans les tissus photosynthétiques mais aussi dans les racines et les graines au niveau des péroxysomes et du cytosol. CAT3 est exprimée dans les feuilles et les tissus vasculaires au niveau des mitochondries.

1.3.2.3 L'ascorbate peroxydase

L'ascorbate peroxydase (APX) est une enzyme qui catalyse aussi la réduction de H₂O₂ en utilisant l'ascorbate (ASA) comme donneur d'électrons (figure 10), les produits de la réaction sont l'H₂O et le dihydroascorbate (DHA). Cette enzyme fait partie du cycle ascorbate-glutathion. Les APX constituent une famille de 5 isoformes localisées dans les thylakoïdes, le stroma des chloroplastes, les péroxysomes (Sharma et Dubey, 2004). Les APX sont considérées comme étant plus efficaces que les CAT étant donné qu'elles sont distribuées dans toute la cellule et qu'elles ont une meilleure affinité pour H₂O₂ (Das et Roychoudhury, 2014).

1.3.2.4 La monodéhydroascorbate réductase

La monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) est une enzyme qui permet de régénérer l'ASA à partir du monodéhydroascorbate (MDHA) en utilisant la NAD(P)H comme donneur d'électrons (figure 10). Elle contient un cofacteur flavine et elle est codée par 5 gènes chez *A.thaliana* (Noctor, 2006). Cette enzyme est souvent colocalisée avec l'APX au niveau des péroxysomes, des mitochondries, du chloroplaste et du cytosol car elle permet de régénérer le pool d'ascorbate (Gill et Tuteja, 2010).

1.3.2.5 La déhydroascorbate réductase

La déhydroascorbate réductase (DHAR) réduit le déhydroascorbate (DHA) en ascorbate en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons (figure 10). Cette enzyme participe aussi à la régénération du pool d'ascorbate.

1.3.2.6 La glutathion réductase

La glutathion réductase (GR) catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons. C'est une flavoprotéine qui participe au cycle ascorbate-glutathion et à la régénération du pool d'ascorbate. Elle est localisée surtout dans les chloroplastes mais aussi dans les mitochondries et le cytosol (Das et Roychoudhury, 2014).

Les publications portant sur les enzymes anti-oxydantes montrent que leurs activités sont activées simultanément lors de stress. Wang *et al.*, (2004) ont montré que la surexpression de MnSOD dans des plantes d'*A.thaliana* leur permet de supporter un stress salin de 150 mM NaCl sans montrer le même flétrissement que le sauvage. Cela signifie que la plante surexprimant MnSOD a acquis une meilleure tolérance au stress salin. Cependant, la Cu/Zn-SOD, la Fe-SOD, la CAT, la peroxydase montrent une augmentation significative de leur activité. Le contenu de malondialdéhyde (MDA), qui est produit de la peroxydation des lipides, est réduit. Tous ces résultats indiquent qu'il y a une activité antioxydante plus importante chez les plantes surexprimant MnSOD soumises à un stress salin.

Dans une étude de Lehner *et al.*, (2008), l'effet d'un traitement de vieillissement à 45°C et 100 % d'humidité relative pendant 7 jours sur des grains de blé a été étudié. Les graines commencent à perdre leur viabilité au 5ème jour et elles sont mortes au 7ème. La germination commence à décliner à partir du 5ème jour également. La production de H₂O₂ diminue entre les jours 2 et 4 pour augmenter fortement à partir du 5ème jour, l'activité catalase montre des tendances inverses à celles-ci. L'activité SOD est forte jusqu'au 3ème jour puis diminue jusqu'à être nulle au 5ème jour. L'activité GR ne cesse d'augmenter pendant toute la durée du traitement. Cette étude montre que les enzymes CAT et SOD sont

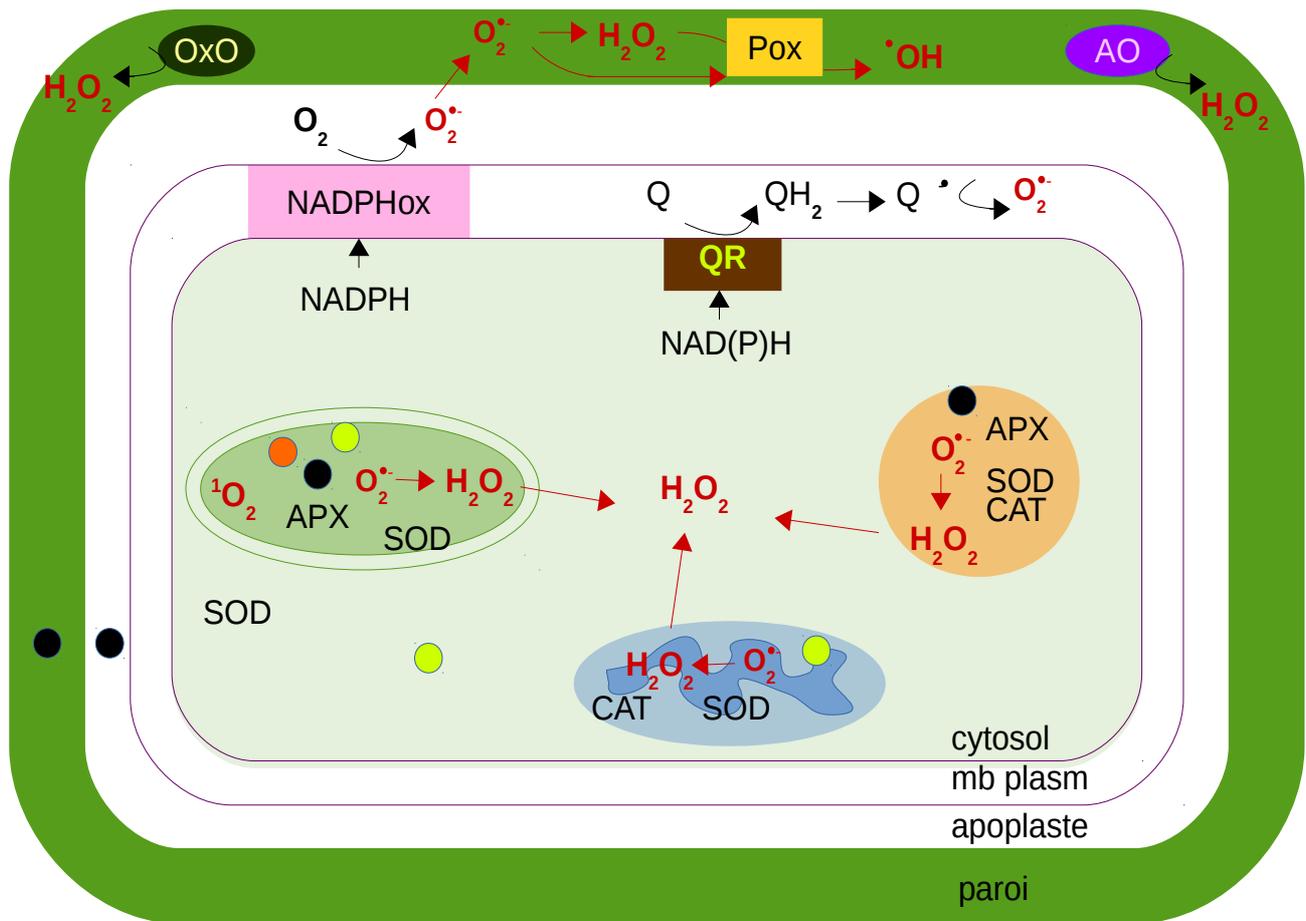


Figure 11 : Schéma de la production et de la détoxification des ROS dans une cellule végétale. Les organites comme la mitochondrie (en bleu), le chloroplaste (en vert) et le peroxylysosome (en orange) produisent du $O_2^{\cdot-}$ qui peut être dismuté grâce à la superoxyde dismutase (SOD) en H_2O_2 . La catalase (CAT) et l'ascorbate peroxydase (APX) catalysent la production d'eau à partir de H_2O_2 . Pour des soucis de clarté, la MDHAR, la DHAR et la GR ne sont pas indiquées mais elles se trouvent au même endroit que l'APX. Le chloroplaste contient des caroténoïdes (rond orange) et du glutathione (rond jaune) pour détoxifier les ROS. La mitochondrie contient aussi du glutathione et de l'ascorbate (rond noir). Le H_2O_2 peut être transporté à travers les membranes vers le cytosol par diffusion passive ou plus efficacement par les aquaporines. Le cytosol contient aussi des antioxydants comme la SOD, et des enzymes détoxifiants le H_2O_2 (APX et CAT). Les QR produisent du $O_2^{\cdot-}$ au niveau de la membrane plasmique. La NADPH oxydase produit du $O_2^{\cdot-}$ à l'apoplaste, qui peut être détoxifié par de l'ascorbate. Le superoxyde diffuse dans la paroi et peut être dismuté en H_2O_2 puis servir à la formation de $HO\cdot$ par les peroxydases pariétales (Pox). Les amines oxydases (AO) et les oxalate oxydases (OxO) catalysent la formation de H_2O_2 au niveau de la paroi.

efficaces pour diminuer les stress lié à la production de ROS mais que lorsque ces systèmes sont dépassés, la GR ne suffit pas à palier leur manque. Cela induit un ralentissement de la germination et une perte de viabilité allant jusqu'à la mort des graines. Ces deux études montrent que l'ensemble de ces enzymes détoxifiantes agissent de concert pour réduire le stress cellulaire lié à la production de ROS.

La figure 11 permet de faire un bilan sur la production et la détoxification des ROS dans la cellule végétale. Les organites comme la mitochondrie, le péroxysome et le chloroplaste sont producteurs de H_2O_2 et de $O_2^{\cdot-}$. Les systèmes de détoxification qui leur sont associées sont identiques au niveau enzymatique (CAT, SOD, APX, MDHAR, DHAR et GR) tandis que les molécules à faible poids moléculaire sont différentes (ascorbate, caroténoïdes et glutathion dans le chloroplaste, ascorbate et glutathion dans la mitochondrie et ascorbate dans le péroxysome). Le H_2O_2 est capable de diffuser de façon passive à travers les membranes des organites mais peut aussi les traverser grâce aux aquaporines. Le cytosol contient toutes les enzymes antioxydantes présentées ainsi que de l'ascorbate et du glutathion. Les QR produisent du $O_2^{\cdot-}$ au sein de la membrane plasmique tandis que les NADPH oxydases en produisent au niveau de l'apoplaste où il peut être détoxifié par l'ascorbate. La paroi cellulaire contient des peroxydases productrices de HO^{\cdot} ainsi que des oxalates oxydases et des amines oxydases qui produisent de l' H_2O_2 . Ces ROS peuvent être détoxifiés par l'ascorbate pariétal.

1.4 Le rôle des ROS dans la croissance cellulaire

Les parties précédentes ont permis d'avoir un aperçu de l'importance des ROS dans le développement des plantes et leur adaptation aux stress environnementaux. Dans cette partie, l'exemple précis de l'élongation cellulaire va être traité. L'accent est mis sur la production de ROS mais il faut savoir que de plus en plus d'études montrent que les ROS interagissent avec les voies de signalisation hormonales (review : Bartoli *et al.*, 2013 ; Xia *et al.*, 2015). Cependant, les mécanismes de production de ROS induit par les hormones sont inconnus pour le moment.

1.4.1 État de l'art

La paroi constitue une barrière mécanique autour de la cellule végétale. Lors de la croissance des cellules, il est nécessaire que la paroi ne restreigne pas l'expansion cellulaire. Ainsi, plusieurs études montrent qu'il y aurait un relâchement de la paroi suite à la production de ROS (les références seront cités par la suite). Ces ROS seraient produits par les NADPH oxydases et les peroxydases pariétales (review : Passardi *et al.*, 2004).

Fry (1998), a étudié le clivage des polysaccharides de paroi par des ROS. Des solutions commerciales de composants pariétaux ont été utilisées pour mesurer leur changement de viscosité. Lorsque la viscosité d'une solution diminue cela signifie qu'il y a eu clivage des polysaccharides. Ainsi, l' H_2O_2 , l'ascorbate, le Cu^{2+} et le Fe^{3+} induisent séparément une augmentation de la vitesse de la réaction de clivage des polysaccharides, leur combinaison accroît davantage la vitesse. Le O_2^- n'a pas d'effet de clivage. La réaction proposée par l'auteur est la réduction par l'ascorbate de l' O_2 en H_2O_2 , du Cu^{2+} en Cu^+ , l' H_2O_2 et le Cu^+ réagiraient ensuite pour former du $\text{HO}\cdot$ ce qui induirait la scission des polysaccharides. Par la suite, Schweikert *et al.*, (2000) ont montré grâce à des mesures par résonance paramagnétique électronique (RPE) que le $\text{HO}\cdot$ peut être généré en présence d'oxygène et de NADH grâce à la peroxydase de radis. Le $\text{HO}\cdot$ produit par la peroxydase induit des clivages au niveau des polysaccharides.

Schopfer *et al.*, (2002) ont utilisé des coléoptyles de plantules de maïs pour montrer que les ROS produits au niveau de la paroi permettent l'extension cellulaire. En présence d'auxine, la génération de $\text{HO}\cdot$ est accrue et l'extension cellulaire est plus importante. La génération de $\text{HO}\cdot$ permet d'induire une extension cellulaire semblable à celle obtenue en présence d'auxine ainsi qu'un relâchement de la paroi. Il semble que le $\text{HO}\cdot$ soit nécessaire à l'élongation cellulaire médiée par l'auxine, cette étude est un exemple important de l'interaction d'une voie de signalisation hormonale et d'un ROS. Ici, l' $\text{HO}\cdot$ est obtenu à partir de O_2^- probablement le produit de la catalyse par la NADPH oxydase. L'étude de Liskay *et al.*, (2003) a permis de déterminer que la production de O_2^- est due à une NADH oxydase sensible à l'auxine au niveau de la membrane plasmique.

Le relâchement de la paroi cellulaire et le clivage des polysaccharides de la paroi sont des processus importants lors du développement des plantes. Deux études portant sur la

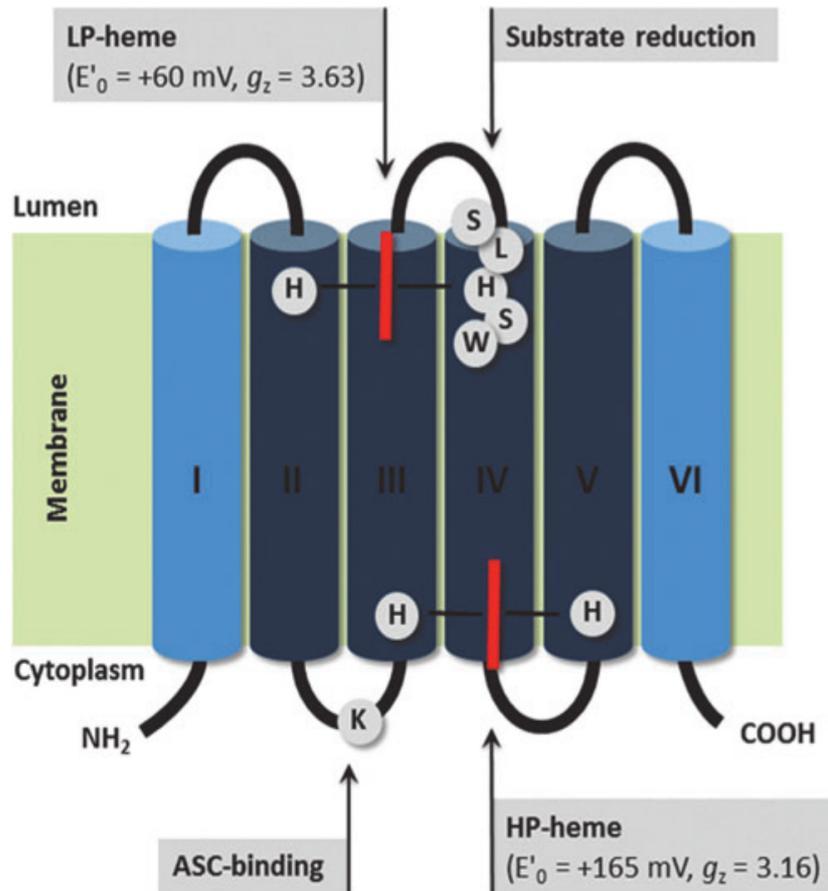


Figure 12 : Schéma de la structure 3D du cytochrome TCytb/CYB561B1 d'*A.thaliana*. Cette structure est typique d'un cytochrome b 561. Les CYB561 sont composés de 6 domaines transmembranaires (I-VI) (en bleu) et deux hèmes de type b (traits rouges) coordonnés par 4 His conservés situés au niveau des hélices II-V formant le coeur (en bleu foncé). Dans cet exemple, l'hème à fort potentiel (HP-heme) situé du côté de l'apoplaste accepte des électrons de l'ascorbate. Figure issue de Asard *et al.*, 2013.

germination montrent que ces processus interviennent dans la rupture de l'endosperme (Muller *et al.*, 2009) et l'émergence de la radicule (Singh *et al.*, 2015). Singh *et al.*, (2015) montrent que l'inhibition des peroxydases ainsi que l'utilisation d'un scavenger de l' HO^\cdot inhibent la germination de graines de haricot mungo. L'activité des peroxydases et la germination sont partiellement inhibées par le blocage des canaux calciques et du transport de Ca^{2+} . Le modèle des auteurs est qu'une cascade de signalisation débute par la production de O_2^\cdot par la NADPH oxydase. Le O_2^\cdot est ensuite dismuté en H_2O_2 à son tour converti en HO^\cdot par la peroxydase. L' HO^\cdot relâche la paroi cellulaire et permet l'élongation des cellules de l'axe embryonnaire.

Ainsi, ces différentes études montrent que la production de ROS interagit avec des voies de signalisation cellulaires qui permettent l'élongation cellulaire et le développement des plantes.

Aucune étude ne porte sur le rôle des QR dans ce processus, et pourtant ces enzymes sont aussi impliquées dans la production de O_2^\cdot (Schopfer *et al.*, 2008 ; Heyno *et al.*, 2013). Il est possible que son activité ne soit pas visible étant donné qu'elle est souvent confondue avec celle de la NADPH oxydase (Heyno *et al.*, 2011).

1.4.2 Hypothèse d'un transfert d'électrons à travers la membrane plasmique

Dans la partie portant sur les QR (1.2.2.2.2), leur fonctionnement a été décrit. Ce sont des enzymes cytosoliques qui ont une affinité pour la membrane plasmique. Elles catalysent la réduction de quinone au sein de la membrane ce qui induit la formation de quinone radicalaire et de O_2^\cdot . Des études protéomiques ont permis de déterminer que des QR s'agrègent au niveau de rafts lipidiques avec de nombreuses protéines dont des cytochromes de type b561 qui sont largement représentés au sein de la membrane plasmique (Kierszeniowska *et al.*, 2009 ; Lefebvre *et al.*, 2007). Lefebvre *et al.*, (2007) émettent la possibilité que ces candidats, les QR et les cytochrome de type b561, pourraient former un flux d'électrons à travers la membrane plasmique et ainsi réguler l'état rédox dans le cytoplasme et l'apoplasme.

Les cytochromes de type b561 (CYB561) constituent une famille de protéines transmembranaires contenant deux hèmes. Ils sont présents dans différents organes et tissus

chez les animaux et les végétaux (Asard *et al.*, 2013). Ils peuvent régénérer l'ascorbate à partir de la réduction du monodéhydroascorbate (MDHA). Le nom de cytochrome b561 provient de l'absorption maximum à 561 nm de la bande α qui est caractéristique de ces cytochromes. Ils sont composés de 6 hélices α transmembranaires dont les 4 centrales forment le coeur du cytochrome (figure 12). Les 4 hélices du cœur contiennent 4 histidines conservées permettant de coordonner les deux hèmes de type b (Okuyama *et al.*, 1998). Un hème à haut potentiel est tourné du côté du cytoplasme tandis que le second à plus bas potentiel est du côté de l'apoplaste. Chez les plantes, la purification à partir de membrane plasmique de soja ainsi l'identification d'un CYB561 ont été faites récemment par Preger *et al.*, (2009). Il s'agit de AIR12 pour Auxin-Induced in Root cultures qui est codé par un seul gène chez *A.thaliana*. Cette protéine a été identifiée précédemment par Laskowski *et al.*, (2006). Des expériences microarray ont permis de trouver 80 gènes dont AIR12 régulés positivement dans les racines d'*A.thaliana* après 12 heures de traitement à l'auxine. AIR12 est donc un gène régulé de façon précoce par l'auxine lors de la formation de racines latérales. AIR12 est une protéine hydrophile, glycosylée et il est prédit qu'elle s'associe *in vivo* au niveau de la membrane plasmique, tournée vers l'apoplaste, grâce à une ancre lipidique de type GPI pour glycosylphosphatidylinositol (Borner *et al.*, 2003). Preger *et al.*, (2009) ont pu mesurer le potentiel rédox de AIR12, il y a deux potentiels de demi-vagues estimés à pH 7.0 : à 137 mV et à 236 mV. AIR12 s'associerait au niveau de rafts lipidiques avec d'autres protéines rédox comme des QR (Lefebvre *et al.*, 2007). De plus, Costa *et al.*, (2015) ont montré que AIR12 peut être réduit par le $O_2^{\cdot-}$ *in vitro*.

Une étude porte sur la caractérisation du mutant perte de fonction *air12* (Gibbson et Todd, 2015). Le mutant montre une germination accrue par rapport au sauvage dans des conditions contrôle mais aussi en présence de différents stress (KCl, mannitol, sucrose, nitrate, H_2O_2) et d'auxine. En présence d'ABA, la germination est identique au sauvage. Le développement des racines primaire et latérales est affecté et ce phénotype est lié à une réduction d'un facteur trois de l'activité catalase par rapport au sauvage et une diminution de production du $O_2^{\cdot-}$. L'ajout de H_2O_2 induit une augmentation de l'activité catalase d'un facteur deux. D'après les auteurs, AIR12 permettrait de relier la signalisation hormonale et les ROS dans les plantes.

AIR12 partage un point commun avec FQR1 : leur expression est induite de manière précoce par l'auxine. AIR12 partage aussi un point commun avec NQR : un profil

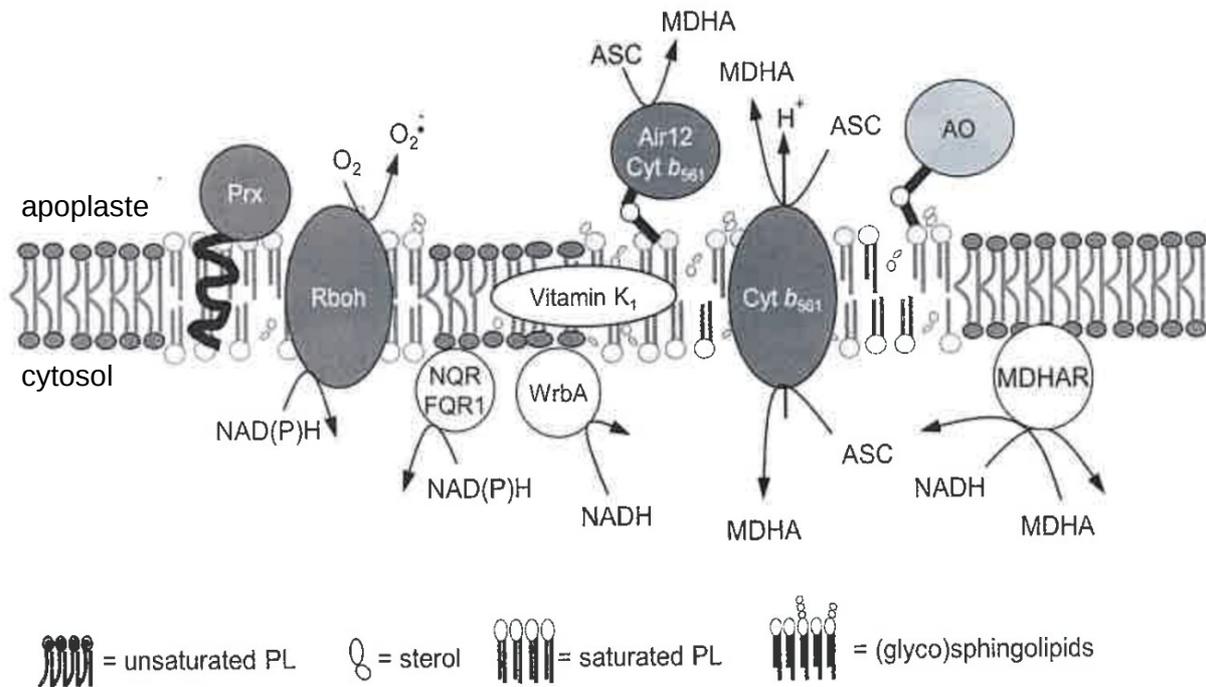


Figure 13 : Modèle d'agrégation de protéines rédox au niveau de la membrane plasmique. Les QR et AIR12 se retrouvent de part et d'autre de la membrane contenant la vitamine K1 qui est une quinone. PRX signifie peroxydase, Rboh Respiratory Burst Oxidase ou NADPH oxydase, WrbA est l'homologue des QR végétales (NQR et FQR) chez les bactéries, cyt b561 cytochrome b 561, AO est l'ascorbate oxydase et MDHAR la monodéhydroascorbate. Figure modifiée à partir de Luthje *et al.*, 2013.

phytopathologique semblable de mutants affectés au niveau de ces 2 protéines. Suite à l'infection d'*A.thaliana* par *B.cinerea*, les mutants KO de AIR12 montrent (Costa *et al.*, 2015) une taille de lésion plus faible que le sauvage comme cela a été montré pour le mutant KO de NQR (Heyno *et al.*, 2013). Cependant, la production de ROS des mutants *air12* n'est pas affectée. L'ensemble de ces résultats peut laisser penser à une interaction des deux protéines au niveau de la membrane plasmique. Le modèle de Luthje *et al.*, (2013) (figure 13) montre des protéines rédox qui s'agrègent au niveau de rafts lipidiques. Les QR sont localisées du côté cytosolique de la membrane plasmique tandis que AIR12 se trouve du côté apoplastique. La membrane contient une quinone qui est la vitamine K1, un substrat potentiel des QR. Ces 3 éléments pourraient créer un flux d'électrons à travers la membrane plasmique. Cependant, cette hypothèse nécessite d'être vérifiée par d'autres études.

1.5 Le rôle des ROS sur la qualité des graines

La graine est une phase du cycle du développement des plantes primordiales car elle assure la pérennité et la dispersion des espèces. Au niveau agricole, la germination de la graine est l'étape critique de la production qui va déterminer le succès de la future récolte. La qualité des semences est une caractéristique essentielle pour la production agricole et la sécurité alimentaire, en particulier dans un contexte de changement climatique.

1.5.1 Définition de la qualité des graines

La qualité des semences est mesurée grâce à des paramètres comme la viabilité, la pureté des lots, la santé et la vigueur des semences (Finch-Savage et Bassel, 2015). La vigueur correspond à la somme des propriétés qui déterminent l'activité et la capacité des lots de semences à germer dans un large éventail d'environnement selon l'International Seed Testing Agency (ISTA, 2015). Cette définition assez vague comprend une multitude de paramètres mesurables : les taux et l'uniformité de la germination et de la croissance des plantules, la capacité des semences à germer dans des conditions défavorables, la capacité à germer après avoir été stocké (Finch-Savage et Bassel, 2015). Ces paramètres dépendent de la

plante mère lors du développement des graines, des conditions environnementales lors de la culture et aussi de la qualité du stockage après la récolte.

1.5.2 Influence de la plante mère sur la qualité des graines

Les plantes étant des organismes sessiles, elles doivent s'adapter à leur environnement tout en continuant à croître et à se reproduire. Lors du développement des graines au sein de la plante mère, des stress environnementaux subi par la plante peuvent avoir des effets sur le phénotype des graines, c'est ce qui est appelé l'effet maternel (Rasanen et Kruuk, 2007).

Différentes études (Kendall *et al.*, 2011 ; Springthorpe et Penfield, 2015) montrent que les conditions de culture de la plante mère peut influencer sur la dormance des semences. La dormance est définie comme l'incapacité de semences viables à germer dans des conditions apparemment favorables (Bewley, 1997). Chez les plantes annuelles d'été originaires des climats tempérés, la dormance permet aux semences de les empêcher de germer en automne mais plutôt d'attendre le printemps qui a pourtant des conditions environnementales similaires. Ainsi, en empêchant la germination en automne, la plante n'a pas à accomplir son cycle de vie pendant l'hiver, saison qui lui serait défavorable. Le froid de l'hiver permet la levée de dormance par stratification des semences (Vleeshouwers *et al.*, 1995). Lors de la maturation des semences sur la plante mère, quand la température est basse, les graines produites sont plus dormantes (Springthorpe et Penfield, 2015). Chez *A.thaliana*, la dormance provient de l'embryon, il n'y a pas de germination tant que la graine n'est pas mature, mais aussi de l'enveloppe qui constitue une barrière physique à l'émergence de la radicule.

Kendall *et al.*, (2011) ont montré que le transcriptome d'*A.thaliana* est très sensible à la température et que des températures basses (10°C) induisent des gènes associés à la dormance. De plus, les niveaux d'acide abscissique (ABA) et de gibbérellines (GA) ainsi que l'expression de DOG1 (delay in germination 1) sont modifiés dans les graines matures. La balance de ces deux hormones est connue pour influencer la dormance (Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006). L'ABA est un régulateur positif du maintien de la dormance lors de l'imbibition des semences tandis que les GA induisent une sortie de dormance. Il existe une balance entre la biosynthèse et la dégradation de ces deux hormones qui permet la régulation de la dormance. Il a été montré que le froid utilisé pour lever la dormance par stratification

des graines d'*A.thaliana*, induit l'expression de gènes de la biosynthèse des GA comme *AtGA3ox1* mais aussi la diminution de transcrits du gène du catabolisme des GA, *AtGA2ox1* (Yamauchi *et al.*, 2004). Pour ce qui est du gène *DOG1*, il est considéré comme étant un marqueur de la dormance (Bentsink *et al.*, 2006). Son expression est induite lorsque les graines ont mûri à 10°C (Chiang *et al.*, 2011 ; Kendall *et al.*, 2011) et il semblerait qu'il induise le catabolisme des GA ce qui permettrait le maintien de la dormance des semences d'*A.thaliana*.

La graine d'*A.thaliana* est composée d'un embryon entouré d'une couche d'endosperme et d'une enveloppe. L'enveloppe est un tissu d'origine maternelle composé de différentes couches qui meurt lors de la maturation des semences (Debeaujon *et al.*, 2000). La couche interne appelé endothélium accumule des proanthocyanidine appelé tanins condensés chez *A.thaliana* (Rajjou et Debeaujon, 2008). Ce sont ces flavonoïdes qui donnent la couleur à l'enveloppe des graines. Des mutants d'*A.thaliana* déficients au niveau de la pigmentation de leur enveloppe montrent une dormance réduite et une germination plus rapide ainsi qu'une plus grande perméabilité de l'enveloppe. Lorsque les semences mûrissent à 10°C, les enveloppes sont davantage perméables et accumulent moins de proanthocyanidine (Mac Gregor *et al.*, 2015). La plante mère peut également réguler la concentration en pigments de l'enveloppe et leur perméabilité ce qui influe également sur leur dormance.

L'ensemble de ces informations montre que des températures basses lors de la culture de la plante mère induisent des effets sur la dormance de la graine. Pour le moment aucun lien n'a été fait avec les ROS dans ces conditions. Cependant, ils jouent un rôle important dans la germination.

1.5.3 Accumulation de ROS dans les graines sèches et vieillissement naturel

Les graines orthodoxes subissent, après la maturation, une déshydratation ce qui leur permet d'être dans un état de quiescence (Bewley, 2013). Le métabolisme est alors quasiment inactif et la teneur en eau est réduite (5 à 15%). C'est dans cet état de quiescence que les semences sont capables de survivre plusieurs mois à plusieurs années.

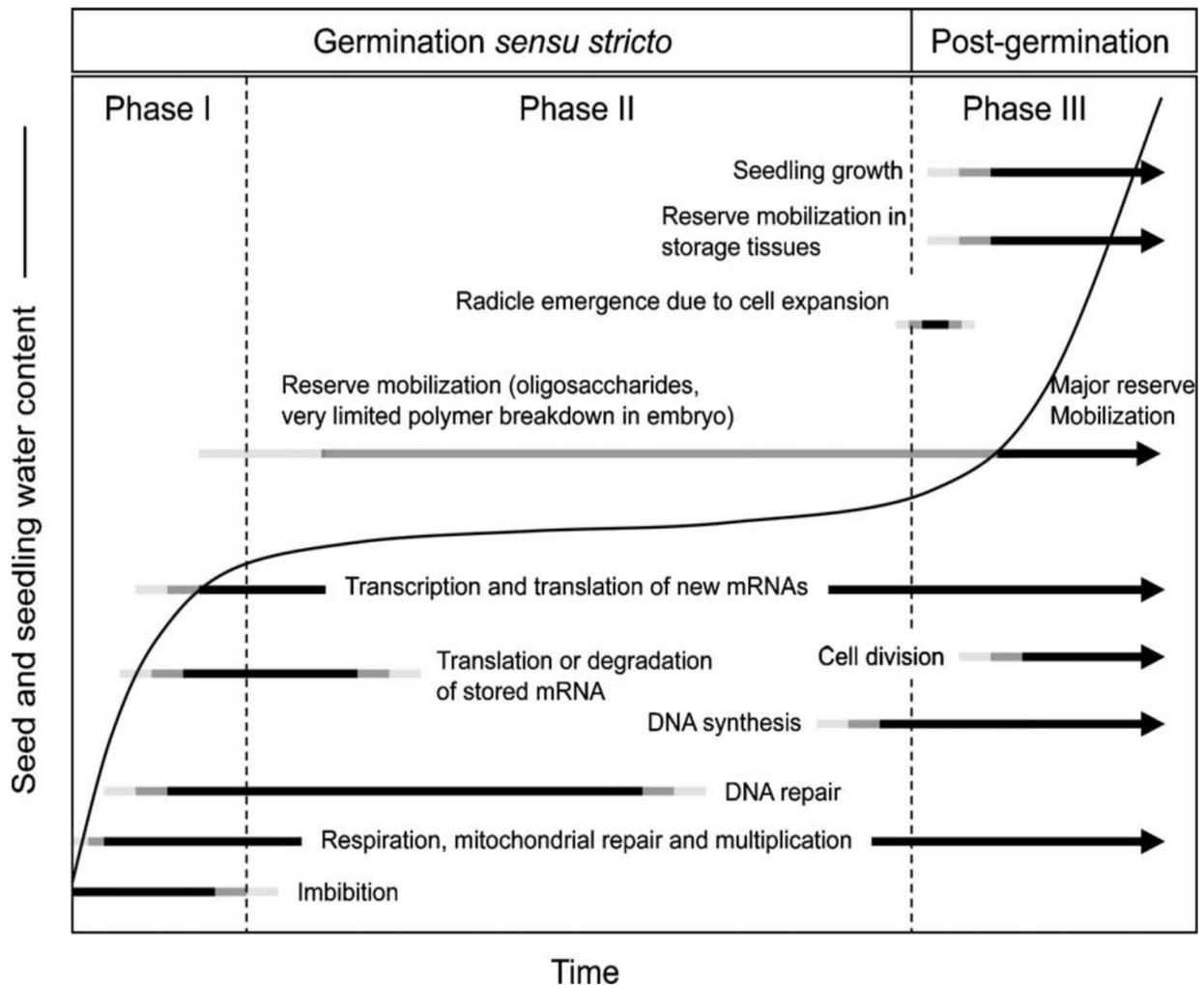


Figure 14 : Evolution des processus physiques et métaboliques lors de la germination (phase I et II) et lors de la croissance post-germinatoire (phase III). La courbe représente l'absorption d'eau par la graine au cours du temps. Les jauges allant du gris clair au noir représentent l'intensité des événements indiqués à côté. D'après Nonogaki *et al.*, 2010.

Lorsque les semences sont sous forme déshydratée, les chloroplastes ne sont plus fonctionnels et ne produisent donc plus de ROS. De plus, étant donné que le métabolisme est très faible, la production enzymatique de ROS *via* la chaîne respiratoire ou par les diverses enzymes pro-oxydantes est négligeable (Bailly 2004). Dans ce cas, ce sont les réactions non enzymatiques telles que Fenton et Haber-Weiss qui produisent les ROS ainsi que l'auto-oxydation des lipides. Lors du développement les semences accumulent des petites molécules anti-oxydantes telles que des flavonoïdes et des tocophérols (Rajjou *et al.*, 2008a). Il existe également des protéines telles que les LEA (late-embryogenesis abundant) et les PIMT (L-isoaspartyl méthyltransférase) qui respectivement protègent (Grelet *et al.*, 2005) et réparent les enzymes (Ogé *et al.*, 2008).

1.5.4 Le rôle des ROS dans la germination

1.5.4.1 Définition de la germination

La germination comprend les événements à partir de l'absorption d'eau par les graines sèches jusqu'à l'allongement de l'axe embryonnaire (Bewley, 1997). Une graine est dite germée lorsque les structures entourant l'embryon sont pénétrées par la radicule.

La description des différentes phases de la germination peut se faire par l'évolution de l'absorption de l'eau par la graine au cours du temps représenté par la figure 14. Il y a 3 phases : la première est marquée par une absorption d'eau rapide (phase I) qui se poursuit par un plateau (phase II). La phase III, lorsque la germination est terminée, est marquée par une nouvelle augmentation de l'absorption d'eau (Bewley, 1997).

Lors de la phase I, la réhydratation des semence, appelée imbibition, induit de nombreux dommages (Nonogaki *et al.*, 2010). Il y a des fuites de solutés ce qui indique des dommages au niveau des membranes plasmiques. Cette fuite a lieu lors de la transition d'état des acides aminés de la membrane plasmique de la phase gel à la phase fluide (Crowe, 1989). Les mitochondries sont endommagées et peu nombreuses alors qu'elles sont indispensables à la respiration et au métabolisme des graines. Elles vont être remplacées et réparées à partir de la phase I. Les enzymes, l'ADN et les ARN messagers sont aussi réparés. Les ARN messagers présents ayant servi à la synthèse de protéines protectrices comme les LEA sont dégradés

ainsi que ceux ayant servi lors du développement de la graine. La synthèse de nouveaux ARN messagers débute aussi. Lors de cette phase, la reprise métabolique marque également la reprise de la production des ROS qui conduit à un burst oxydatif (Bewley, 1997).

La phase II est marquée par la poursuite des réparations cellulaires et la synthèse de nouvelles protéines. Les phases I et II caractérisent la germination *sensu stricto* c'est-à-dire avant l'émergence de la radicule.

Le début de phase III est marquée par l'émergence de la radicule c'est alors que le développement post-germinatoire débute. C'est l'élongation cellulaire médiée par la production de ROS au niveau apoplastique qui permet l'émergence de la radicule (voir partie 1.4.1).

La germination est induite par de nombreux facteurs environnementaux comme la température, la lumière, la disponibilité en oxygène et en eau. Les hormones végétales jouent aussi un rôle essentiel dans le contrôle de la germination. Les gibbérellines (GA) et l'éthylène induisent la germination tandis que l'acide abscissique (ABA) l'inhibe (review : Diaz-Vivancos, 2013). Le rôle des cytokinines, de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique est moins clair. Cependant, de plus en plus d'études montrent qu'il existerait une interaction entre les voies de signalisation hormonales et les ROS.

1.5.4.2 Effet des ROS dans la germination

Des tests de germination en présence de H₂O₂ ou de composés générateurs de ROS comme le méthylviologène (MV) et la ménadione (MD) montrent chez plusieurs espèces une induction de la germination. Chez le tournesol, la germination de graines dormantes en présence de MV montre une germination quasiment identique aux graines non dormantes (Oracz *et al.*, 2007, 2009) et le MD induit une levée de la dormance partielle. Des effets semblables sont obtenus chez *A.thaliana* (Leymarie *et al.*, 2012). Enfin, l'H₂O₂ et le MD induisent une levée de la thermodormance, c'est-à-dire la dormance induite par la température, ici 30°C (Bahin *et al.*, 2011). L'ensemble de ces résultats indiquent que les ROS induisent la levée de la dormance. Des dosages de H₂O₂ et de O₂⁻ chez ces différentes espèces permettent de confirmer que les semences non dormantes produisent plus de ROS que les

semences dormantes. Ainsi, les ROS sont aujourd'hui connus pour induire la germination lors de la phase II d'imbibition (Bailly *et al.*, 2008).

Deux mutants d'insertion de la NADPH oxydase sont affectés au niveau de la germination. Muller *et al.*, (2009) ont montré que des mutants *rbohB* germent deux fois plus rapidement que le sauvage. Leymarie *et al.*, (2012) ont montré que le mutant *rbohD* ne germe pas lorsque les semences sont dormantes et germe très lentement lorsqu'elles sont non dormantes (au bout de 10 jours 30 % contre 100 % pour le sauvage au bout de 2 jours). Même si ces deux résultats semblent différents, il est possible que ces deux isoformes de la NADPH oxydase aient un rôle différent dans la germination. Il n'en demeure pas moins que des mutants de la NADPH oxydase ont des phénotypes germinatoires affectés.

L'utilisation de scavengers ou piègeurs de ROS induit aussi des réductions de la dormance. Le sodium benzoate (scavenger général de ROS), le Tiron (scavenger de $O_2^{\cdot-}$), le DMTU (scavenger de H_2O_2) induisent une réduction de germination qui est légère chez *A.thaliana* (Leymarie *et al.*, 2012) et très forte chez le tounesol (Oracz *et al.*, 2009). Le DPI qui est un inhibiteur de la NADPH oxydase induit une forte réduction de la germination chez *A.thaliana* (Leymarie *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces résultats montre que les ROS jouent un rôle essentiel dans la levée de dormance et la germination. D'autres preuves de l'implication des ROS dans la germination sont exposés dans la section suivante sur le vieillissement.

1.5.4.3 Vieillessement des semences et ROS

De nombreuses études montrent qu'un stockage dans de mauvaises conditions ou un stockage trop long peuvent avoir des conséquences sur la germination et la vigueur (Sung et Chiu, 1995 ; Ratajczak *et al.*, 2015). Cette perte de qualité au cours du stockage est corrélée à une augmentation de la teneur en ROS de ces semences. Sung et Chiu (1995) ont étudié l'effet de la durée de stockage (0 à 12 mois) et de la température (5°C ou 25°C) sur des semences de soja. Plus le stockage est long, plus la germination est réduite aux deux températures et ces effets sont accentués par le stockage à 25°C. Ces effets sont corrélés à une augmentation de la concentration en H_2O_2 . Dans l'étude de Ratajczak *et al.*, 2015, des graines de hêtre ont été stockées à -10°C pendant 2 à 13 ans. La germination diminue de 100 % à 20 % au bout de 13

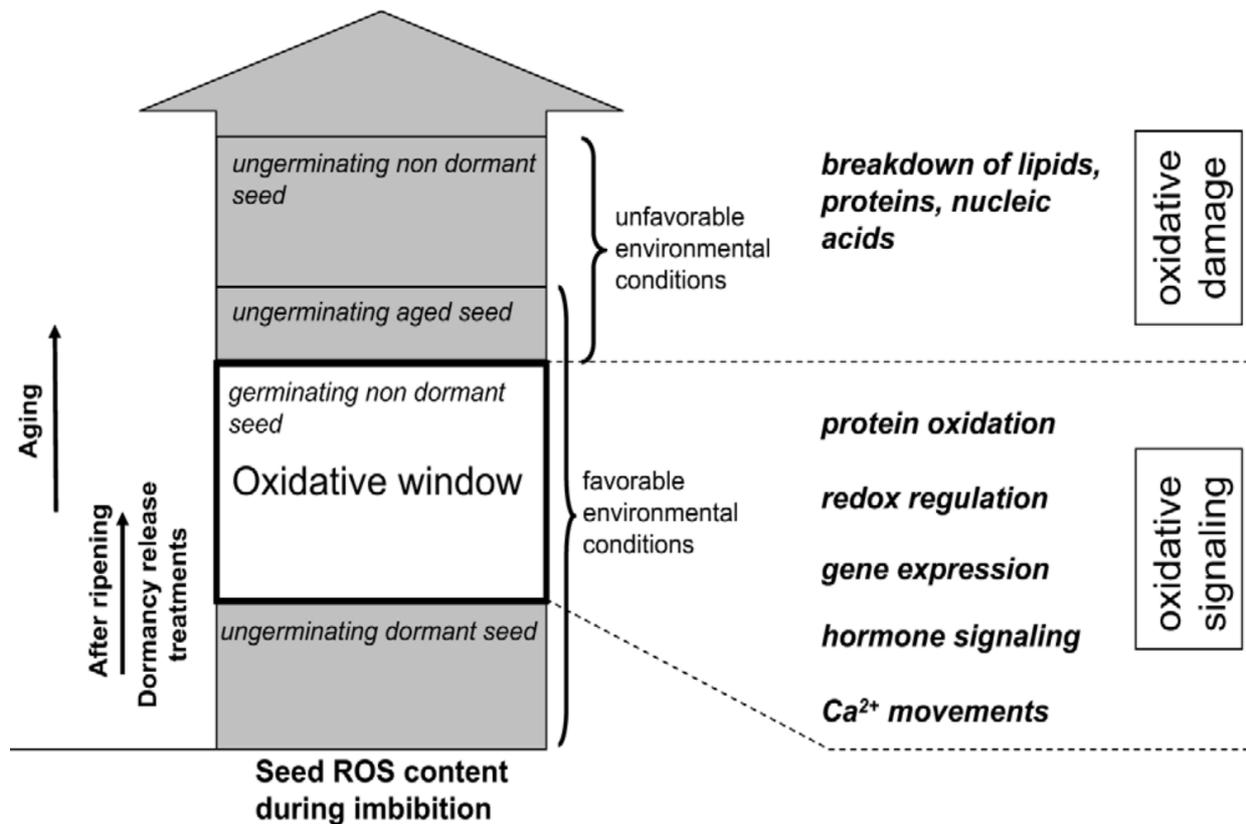


Figure 15 : Théorie de la fenêtre oxydative permettant la germination des graines. Lorsque la teneur en ROS est faible, la dormance n'est pas levée et les semences ne germent pas. La germination est possible lors de la fenêtre oxydative car la dormance est levée. Lorsque la teneur en ROS est forte, les semences vieillissent et sont endommagées au niveau cellulaire. D'après Bailly *et al.*, 2008.

ans et la production de H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ et HO^{\cdot} augmente au fur et à mesure du stockage. Ainsi, la durée et la température de stockage influent sur la germination et la production de ROS des graines.

Ces études portent sur des semences ayant vieilli naturellement pendant des années. En laboratoire et en un temps plus court, il est possible de mimer l'effet du vieillissement naturel par des traitements de détérioration contrôlée (CDT ; Rajjou *et al.*, 2008b). Ils reposent sur des traitements de durée variant selon les espèces et à une humidité relative (HR) allant de 70 % à 100 % et des températures de 40 à 50°C.

Des CDT ont été faits sur une multitude de semences telles que le tournesol (Kibinza *et al.*, 2011 ; Morscher *et al.*, 2015), le blé (Lehner *et al.*, 2008), l'avoine (Kong *et al.*, 2015), le riz (Yin *et al.*, 2014). Quelque soit l'espèce, le CDT induit une augmentation de la production de ROS dans les semences et une réduction de la germination. Lorsque les mesures ont été faites (Lehner *et al.*, 2008) la viabilité des semences diminue. Globalement pour toutes les études, à l'issue du CDT, l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la CAT, la SOD, l'APX, la GR et la MDHAR et la teneur en molécules antioxydantes à faible poids moléculaire (ascorbate, glutathion) diminuent.

La CDT induit de nombreux dommages cellulaires qui peuvent conduire à l'inactivation d'enzymes anti-oxydantes qui sont alors incapables de détoxifier les ROS. Les graines subissent alors un stress oxydatif important qui entraîne leur mort. Au niveau agronomique, de telles pertes engendrent de fortes pertes de rendement. Comprendre les mécanismes qui régissent le vieillissement des semences est donc primordial pour établir une production agricole performante.

1.5.4.4 Théorie de la fenêtre oxydative

Les ROS jouent un rôle ambivalent dans les semences tout comme dans la plante entière. Ils sont nécessaires à la levée de dormance et à la germination mais lorsqu'ils s'accumulent, ils induisent des dommages cellulaires pouvant aller jusqu'à la mort des graines. C'est pourquoi, Bailly *et al.*, (2008) ont proposé la théorie de la fenêtre oxydative (figure 15). Lorsque la teneur en ROS est faible dans les semences, cela ne permet pas la levée de dormance ni la germination. Lorsque la teneur en ROS est forte, les semences ne

germent pas mais vieillissent. Elles subissent de nombreux dommages cellulaires au niveau des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Les systèmes anti-oxydants sont dépassés ce qui entraînent une forte accumulation de ROS pouvant mener à la mort cellulaire. Entre les deux il existe une fenêtre oxydative permettant la germination. La balance entre production de ROS et détoxification est maintenue et les ROS agissent comme des molécules signal pour induire la levée de dormance et la germination.

1.6 Objectifs de la thèse

Ma thèse a pour objectif l'étude de la production de ROS dans les graines et les plantules.

Le premier objectif est de déterminer l'impact du changement climatique sur la qualité des semences produites. Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet européen ECOSEED. L'étude porte sur quatre espèces différentes : la plante modèle *A.thaliana*, ainsi que 3 plantes d'intérêt agronomique, *Helianthus annuus* (le tournesol), *Brassica oleracea* (le chou), *Hordeum vulgare* (l'orge). Mon travail a porté sur la mise en place d'un dosage de superoxyde pour chaque espèce de semences ainsi que le dosage de radicaux libres par résonance paramagnétique électronique (RPE) à haut champ.

Le deuxième objectif est de caractériser 3 mutants QR : *nqr*, *fqr1* et *nqrfqr1*. Les enzymes QR ont un rôle indéfini dans les cellules végétales. Elles ont un rôle détoxifiant car en réduisant les quinones en dihydroquinones, elles évitent la production de semiquinones qui sont des quinones radicalaires. Cependant à pH alcalin, les dihydroquinones s'autooxydent et forment des semiquinones qui en réagissant avec l'oxygène produisent du $O_2^{\cdot-}$. Des tests de germination ont été faits dans différentes conditions, ensuite le travail a été poursuivi au niveau de plantules et de plantes jusqu'à 4 semaines de croissance. Des stress sont appliqués afin de déterminer l'importance de ces enzymes dans le développement d'*A.thaliana* et d'élucider le rôle pro- et/ou anti-oxydant des QR.

Le troisième objectif est de caractériser les mutants *nqr* et *air12* et *nqrair12*. AIR12 est un cytochrome b561 ancré à la membrane plasmique du côté de l'apoplaste. Il est un candidat proposé pour le transfert d'électrons à travers la membrane plasmique *via* les QR. Il a déjà été montré que les mutants *nqr* et *air12* ont des profils similaires de production de ROS suite à l'infection par des champignons ce qui concorde avec l'hypothèse d'un transfert d'électrons. Le but de ce travail est de voir ce qu'il en est au niveau des graines et des plantes stressées.

Le quatrième objectif porte sur la caractérisation *in vitro* de deux protéines NQR et AIR12. Une première partie porte sur l'évaluation de la qualité de l'enzyme NQR produite ainsi que de la mesure de son potentiel rédox. Ensuite, la réduction de AIR12 est étudiée grâce à différents substrats potentiels.

2. Matériels et Méthodes

Les produits chimiques utilisés proviennent de Sigma-Aldrich et Merck sauf indication contraire.

2.1 Description du matériel végétal

2.1.1 Production de 4 espèces de graines (ECOSEED)

2.1.1.1 *Helianthus annuus*

Les plantes de tournesol ont été cultivées en plein champ à Marchena en Andalousie (Espagne) par le partenaire industriel du projet ECOSEED, Limagrain Europe. Les cultivars B (hybride C18:3 pauvre en acide gras) et C (hybride C18:1 riche en acide gras) sont étudiés. Les plantes cultivées dans des conditions contrôles (B et C) sont irriguées deux fois de plus que les plantes en stress hydrique (Bs et Cs) lors de la phase de remplissage des graines. Les graines sont récoltées, séchées et stockées à -80°C.

2.1.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Les plantes d'*A.thaliana* ont été cultivées en chambre de culture par nos partenaires de l'Université de Warwick. Elles sont de génotype sauvage (WT) et d'écotype Columbia (Col). Toutes les plantes sont cultivées en conditions de jours longs : 16 heures en présence de lumière et 8 heures à l'obscurité en conditions contrôle à 22°C/18°C (respectivement, températures de la période lumineuse/ période d'obscurité). Lorsque les premières graines commencent à se développer, certaines sont mises en culture en conditions de stress thermique :16°C/14°C (températures basses : T basse), et 28°C/25°C (températures hautes : T haute). Les graines sont récoltées, séchées et stockées à -80°C.

2.1.1.3 *Brassica oleracea*

Les plantes de chou ont été cultivées en serre contrôlée en température par nos partenaires de l'Université de Warwick (Angleterre). Deux génotypes ont été sélectionnés : A12DHd et AGSL101. La vigueur des semences A12DHd est inférieure à celle de AGSL101. Toutes les plantes sont cultivées en conditions de jours longs : 16 heures en présence de lumière et 8 heures à l'obscurité en conditions contrôles 22°C/18°C (jour/nuit). A la fin de la floraison, un tiers des plantes est transféré à 31°C/25°C, ce qui cause un stress thermique (températures hautes). Lorsque l'humidité relative dans les graines des plantes contrôle atteint 70 %, la moitié des plantes est soumise à des conditions de sécheresse à -1.0 MPa. Les graines sont récoltées, séchées et stockées à -80°C.

2.1.1.4 *Hordeum vulgare*

Les plants d'orge ont été cultivés en serre à température contrôlée par nos partenaires du Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (Allemagne). Deux génotypes ont été sélectionnés : HOR 2110 et HOR 4710. Ces graines ont été stockées pendant 38 ans. Les graines HOR 2110 ont une durée de vie courte car seulement 2 % donnent des plantules normales tandis que pour les graines HOR 4710 ce taux s'élève à 94 %; elles ont donc une durée de vie longue. Toutes les plantes sont cultivées en conditions de jours longs : 16 heures en présence de lumière et 8 heures à l'obscurité en conditions contrôles 22°C/ 18°C (jour/nuit).

Sept jours après la floraison, une partie des plantes est transférée en conditions de stress : thermique 28°C /25°C (températures hautes) ou hydrique (sécheresse).

Les graines sont récoltées, séchées et stockées à -80°C.

2.1.2 Matériel végétal pour les projets nqr/ air12

2.1.2.1 Provenance des graines

Les semences d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Columbia (Col) proviennent du European Arabidopsis Stock Centre (uNASc), tandis que les semences d'écotype Landsberg erecta (Ler) ont été fournies par l'équipe de Paolo Trost de l'université de Bologne, Italie. Les lignées de mutants knock out (KO) pour les gènes *nqr* (At3g27890), *fqr1* (At5g54500), *fqr2* (At4g27270), *fqr4* (At4g36750) et *air 12* (At3g07390) ont été transformées par insertion d'ADN-T. Les lignées mutantes stables homozygotes ont été obtenues et certaines publiées : pour *nqr* et *fqr1* par Heyno *et al.*, 2013 et pour *air12* par Costa *et al.*, 2015. Les doubles mutants *nqrfqr*, *fqrfqr* et *nqrair12* ont été obtenus par E. Heyno.

2.1.2.2 Production des graines

Les graines précédemment citées sont semées et cultivées en chambre sous des conditions de jours longs : 16 heures en présence de lumière d'intensité ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à 22°C et 8 heures d'obscurité à 18°C. Après deux mois, les plantes montrent des siliques matures en phase de dessiccation et elles sont alors transférées en chambre de séchage à 32 % d'humidité relative pour deux semaines. Trois cultures indépendantes sont faites et pour chacune, les semences de 16 plantes de même génotype sont mélangées. Ainsi, trois répétitions biologiques sont obtenues. Les graines sont stockées au congélateur à -20°C. Les semences mutantes sont toujours cultivées lors du même cycle de culture que le contrôle (WT) auxquelles elles sont comparées.

2.2 Masse du matériel végétal

2.2.1 Masse de graines sèches produites par plantes

Les graines des 16 plantes des trois répétitions biologiques sont récoltées séparément et pesées.

2.2.2 Masse des graines sèches

1000 graines de chaque génotype sont pesées sur une balance de précision. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats biologiques de 1000 semences.

2.2.3 Masse des plantes adultes

Une première culture contrôle est réalisée en conditions de jours longs (identiques à celles utilisées pour la production des graines) pour les plantes d'écotype Col et Ler pendant 3 semaines. La deuxième culture est réalisée en conditions de stress à 15°C en lumière continue ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pendant 4 semaines. A la fin de chaque culture, les parties aériennes sont coupées des parties racinaires et pesées. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats biologiques de 10 à 15 plantes.

2.3 Physiologie du développement précoce d'*A.thaliana*

2.3.1 Tests de germination

2.3.1.1 Germination en lumière continue

Les graines (50 par génotype par répétition) sont semées dans des boîtes de Petri sur deux couches de papier filtre saturé en eau déminéralisée selon les protocoles établis pour le projet Ecoseed. Elles sont stratifiées pour 24 à 72 heures en chambre froide à 5°C à l'obscurité puis transférées en incubateur sous des intensités lumineuses variables (de 30 ou $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et à des températures variables (5°C à 35°C). Les relevés sont effectués sous une loupe binoculaire. Une semence est considérée comme germée lorsque la radicule perce les enveloppes. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques (soit 6 réplicats au total) de 50 semences.

2.3.1.2 Germination à l'obscurité

Les graines sont semées en boîte de Petri sur une couche de coton saturée en eau déminéralisée et d'un papier filtre selon les protocoles de l'équipe « Biologie des semences » à l'UPMC. Les graines sont soit stratifiées 4 jours (imbibition à 5°C à l'obscurité) soit non stratifiées et directement placées dans des incubateurs à 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats de 80 à 100 semences.

2.3.1.3 Germination en conditions d'hypoxie

Les tests de germination en conditions d'hypoxie ont été effectués au sein de l'équipe « Biologie des semences » à l'UPMC. L'appareil utilisé permet de contrôler la teneur en oxygène de l'atmosphère et de réaliser des essais de germination dans des atmosphères renfermant 1, 3, 5, 10, 15 ou 21 % d'oxygène à 23°C en lumière continue. Les graines sont placées sur un papier filtre et une couche de coton saturés en eau déminéralisée dans des chambres de germination balayées par les mélanges gazeux choisis. Les atmosphères plus ou moins appauvries en oxygène sont obtenues en mélangeant de l'azote et de l'air. Le contrôle de la teneur en oxygène est effectué grâce à un analyseur de type Servomex. Les relevés de germination sont réalisés après 6 jours. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats de 80 à 100 semences.

2.3.2 Traitement de détérioration contrôlée

Le traitement de détérioration contrôlée (CDT) vise à reproduire un vieillissement naturel dans des conditions de laboratoire en un temps court.

2.3.2.1 Pour 4 espèces de graines (ECOSEED)

Le traitement consiste en 3 étapes : l'équilibration, la détérioration et la ré-équilibration. L'équilibration des semences se fait en étuve à 20°C et 32 % humidité relative (HR) pendant 3 jours. La détérioration est effectuée dans une boîte étanche contenant un fond de solution saturée en NaCl garantissant une HR de 75 % et elle est placée dans une étuve à 40°C. La durée de cette étape diffère selon les espèces : 21 jours pour *H. annuus*, 7 jours pour *A. thaliana*, 5 semaines pour *B. oleracea*, 14 jours *H. vulgare*. La ré-équilibration se fait en étuve à 20°C et 32 % HR pendant 3 jours. Les traitements sont réalisés (respectivement par espèce) par les partenaires de : l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC), UPMC, l'Université d'Innsbruck (UIBK), UIBK. Les semences sont ensuite stockées à -80°C.

2.3.2.2 Pour le projet QR

Le traitement a été effectué sur des semences d'*A.thaliana* par Boris Collet, technicien de l'équipe « Physiologie de la germination » à l'IJPB (INRA, Versailles). Les conditions de CDT sont les mêmes que celles utilisées pour les semences du projet ECOSEED, seule la durée de la détérioration diffère (3, 5 ou 7 jours). A la fin du traitement, les semences sont stockées à -20°C jusqu'au jour des semis. Les semences sont stratifiées pendant 3 jours à 5°C à l'obscurité puis placée en chambre de culture à 25°C en lumière continue. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques (soit 6 réplicats au total) de 50 semences.

2.3.3 Croissance de la racicule

Toutes les étapes qui suivent sont effectuées sous hotte stérile afin de limiter les contaminations des cultures. Les semences d'*A.thaliana* sont stérilisées en surface pendant 8 minutes dans une solution 70 % éthanol 0,1 % Triton puis rincées 3 fois pendant 3 minutes dans 96 % éthanol. Les graines sont ensuite laissées à sécher puis semées au cure-dent sur un milieu nutritif gélosé composé de 2,2 g/l Murashige et Skoog (MS), 8 g/l phytigel, 10 g/l

saccharose à pH 6.0. Il est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes puis coulé dans des boîtes carrées stériles.

Les graines sont ensuite stratifiées pendant 3 jours à 5°C à l'obscurité puis transférées et placées à la verticale pour 7 jours en chambre de culture en conditions de jours longs : 16 heures en présence de lumière d'intensité ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à 22°C et 8 heures d'obscurité à 18°C. La croissance de la radicule est marquée chaque jour sur la boîte. Les mesures sont effectuées en fin de culture. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques (soit 6 réplicats au total) de 15 plantules.

2.4 Mesure de paramètres photosynthétiques par IMAGING-PAM

Le fluorimètre à modulation d'amplitude pulsée sert à mesurer la fluorescence de la chlorophylle a de façon non intrusive. Les antennes collectrices de lumière contenant la chlorophylle a ont pour rôle de fournir des photons à la chaîne de transfert d'électrons située dans les membranes des thylakoïdes. L'énergie lumineuse qui y est absorbée, est utilisée pour la photosynthèse et l'énergie en excès peut être dissipée sous forme de chaleur ou bien de fluorescence. Ces trois processus entrent en compétition, dès que le rendement de l'un faiblit les rendements des autres s'amplifient. De cette façon, il est possible en mesurant la fluorescence de connaître les changements d'efficacité de la photosynthèse et de la dissipation de chaleur. Les différents paramètres calculés grâce à cette technique sont F_v / F_m (rendements quantique maximum du photosystème II, PSII), qN (NPQ, Non Photochemical Quenching) et qP (proportion de PSII ouvert). Ils sont calculés à partir de : F_0 est la fluorescence initiale à l'obscurité ; F_m est la fluorescence maximale obtenue après un pulse saturant d'intensité 10000 μE ; F_v est la fluorescence variable induite par une lumière actinique rouge à 635 nm dont l'intensité est choisie (80 μE et 280 μE) ; F_m' est la fluorescence maximale sous lumière actinique. Ainsi les paramètres mesurés correspondent à $F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$, $qN = (F_m - F_m') / (F_m - F_0)$ et $qP = (F_m - F) / (F_m - F_0)$.

Des graines stériles de génotypes sauvage Col, *nqr*, *fqr1* et *nqrfqr1* sont semées dans des boîtes carrées sur un milieu gélosé (MS ou 1/2 MS et 0 % saccharose) et stratifiées 3 jours. La croissance est effectuée en conditions de jours longs à la verticale pendant 10 jours

puis des stress chaud (1 heure à 37°C) et froid (4 jours à 5°C en lumière continue) sont appliqués. La croissance est poursuivie pendant 18 jours. Préalablement aux mesures, les boîtes sont incubées 10 minutes à l'obscurité puis placées directement sous l'IMAGING-PAM (M-Series, Walz, Effeltrich, Allemagne). Plusieurs feuilles du même âge sont mesurées en même temps et les moyennes sont exprimées à partir de mesures prises sur 4 à 6 plantes (les points sélectionnés sont à 350 s pour NPQ, 350 s pour qP et 550 s pour F_v / F_m).

2.5 Biochimie des protéines

2.5.1 Dosage des protéines

2.5.1.1 Méthode de Bradford

Le principe de ce dosage repose sur l'affinité du bleu de Coomassie pour les résidus basiques et aromatiques des protéines (Bradford, 1976).

La solution de Bradford est préparé avec 100 mg/l de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.75 % d'éthanol, 8.5 % d'acide phosphorique puis filtrée à travers du papier Whatman. L'échantillon protéique à doser est ajouté au réactif de Bradford pour un volume total de 1 ml. Après 5 minutes d'incubation, l'absorbance de la solution est mesurée au spectromètre UV-visible (Uvikon XL, Secomam, Alès, France) à 595 nm. La concentration des échantillons protéiques (parties racinaires et NQR recombinante) est une moyenne de 3 mesures indépendantes. La gamme de référence est faite à partir d'une solution de concentration connue d'albumine de sérum bovin (BSA).

2.5.1.2 Méthode par amidoblack

Le dosage repose sur le même principe que le dosage de Bradford. Il est utilisé pour les tissus aériens car dans ce cas le colorant de Bradford interagit avec la chlorophylle et cela fausse les mesures. La solution de dosage est composée de 0.5 % amidoblack, 90 % méthanol, 10 % acide acétique. Les protéines sont diluées dans 200 µl d'eau et 800 µl de solution de dosage. Après 10 minutes de centrifugation à 12500 rpm à 10°C, le surnageant est jeté pour

procéder à un lavage avec 800 µl de solution 90 % méthanol et 10 % acide acétique. Cette étape est répétée 2 fois. Enfin, 1 ml de 0.2 N NaOH est ajouté sur le culot pour permettre de le dissoudre. Après 5 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée au spectromètre UV-visible à 615 nm. Une solution de BSA de concentration connue est utilisée comme référence.

2.5.2 SDS-PAGE

2.5.2.1 Préparation du gel et des échantillons, migration

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE permet la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire dans un champ électrique. Le dispositif utilisé est le Multiple Gel Caster de Hoefer. Chaque gel est composé de deux parties distinctes : le gel de concentration et le gel de séparation. Le gel de concentration est composé de 5 % acrylamide/ Bis-acrylamide, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.1 % ammonium persulfate (APS), 0.1 % TEMED. Le gel de séparation est composé de 12 % acrylamide/ Bis-acrylamide, 375 mM Tris- HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.1 % APS, 0.04 % TEMED.

Les échantillons sont dénaturés grâce à du tampon de dénaturation concentré 5 fois (Tris 250 mM pH 6.8, glycérol 50 %, SDS 20 %, Serva blue G 0.05%) et incubés pendant 5 minutes à 95°C.

Le tampon de migration dans lequel baigne le gel est composé de 25 mM Tris, 0.1% SDS, 192 mM glycine. Lors du passage dans le gel de concentration, la migration se fait à 15 mA, puis à 30 mA lors de la migration au sein du gel de séparation.

2.5.2.2 Coloration du gel au bleu de Coomassie

A la fin de l'électrophorèse, le gel est coloré au bleu de Coomassie (0.1 % Coomassie R-250, 40 % éthanol, 10 % acide acétique) pendant 30 minutes. Il est décoloré grâce à une solution 10 % acide acétique.

2.5.2.3 Coloration du gel au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent est plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie. Cette coloration repose sur le fait que les groupements carboxyliques des protéines peuvent réduire l'argent ce qui va le rendre sensible à la lumière et permettre le développement du gel.

Les protéines du gel sont fixées par une solution 40 % éthanol, 10 % acide acétique pendant 30 minutes. Le gel est ensuite incubé pendant 1 heure dans une solution 30 % éthanol, 0.5 % glutardialdéhyde 25 %, 68 g/l sodium acétate, 2 g/l sodium thiosulfate. Puis il est lavé trois fois 5 minutes avec de l'eau déminéralisée. La coloration au nitrate d'argent se fait dans une solution 1 g/l de nitrate d'argent et 0.02 % formaldéhyde pendant 40 minutes. Le gel est développé 15 minutes dans une solution 25 g/l sodium carbonate, 0.01 % formaldéhyde. La réaction est arrêtée par deux bains successifs de 5 à 10 minutes dans une solution 14.6 g/l EDTA. Le gel est enfin lavé trois fois 5 minutes dans de l'eau déminéralisée.

2.5.2.4 Western Blot

Après la séparation des protéines par SDS-PAGE, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce au système à un système de transfert semi-sec (semi-dry transfer, TE-70 Semi-phor, Hoeffer Scientific Instruments à 40 mA pendant 1 heure. La membrane est ensuite incubée pendant 1 heure dans du tampon PBS-T (0.8 % NaCl, 0.02 % KCl, 0.146 % Na_2HPO_4 , 0.02 % KH_2PO_4 0.1 % Tween-20) et 5 % de lait écrémé en poudre pour bloquer les sites d'interactions non spécifiques des protéines cibles et de l'anticorps primaire. L'incubation avec l'anticorps primaire est réalisée dans du tampon PBS-T contenant 5 % de lait et des anticorps anti-Nqr ou anti-Fqr1 dilué à 1:2000 pendant 2 heures à température ambiante. L'anticorps anti-Nqr (Sparla *et al.*, 1999) nous a été donné par Dr. Paolo Trost (Université de Bologne, Italie) et l'anticorps anti-Fqr1 (Laskowski *et al.*, 2002) par Dr. Marta Laskowski (Université d'Oberlin, Etats-Unis). La membrane est rincée au PBS-T une fois pendant 15 minutes et deux fois pendant 5 minutes. Puis elle est incubée avec l'anticorps secondaire anti lapin (Agrisera, Vännäs, Suède) dilué à 1:20000 dans du PBS-T et 5 % de lait pendant 2 heures. La membrane est à nouveau rincée puis incubée 2 minutes selon

Tableau II : résumé des conditions expérimentales utilisées pour les dosages de superoxyde sur les 4 espèces de graines du projet ECOSEED (T : température, IP : imbibition précoce, IT : imbibition tardive).

Espèce	Matériel	T imbibition (°C)	Durée IP (h)	Durée IT (h)	Volume total (ml)
<i>H. annuus</i>	10 axes embryonnaires	15	6	38	1
<i>A. thaliana</i>	20 mg graines entières	10	6	72	0.5
<i>B. oleracea</i>	4 graines entières	15	10	40	0.5
<i>H. vulgare</i>		20	5	12	

les indications du fabricant du kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences). La détection est faite par chimioluminescence.

2.6 Étude de l'état redox des graines et des plantules

2.6.1 Dosages d'espèces réactives de l'oxygène

2.6.1.1 Dosage du superoxyde par spectroscopie UV-visible

Les conditions utilisées pour les dosages de superoxyde des 4 espèces de graines du projet ECOSEED sont résumées dans le tableau II. Aucune graine n'est stratifiée. Les dosages ont été effectués sur des graines sèches et des graines ayant subi des durées d'imbibition précoce et tardive. La durée d'imbibition précoce correspond au temps nécessaire pour arriver en fin de phase I d'absorption d'eau dans les graines. La durée d'imbibition tardive correspond à 80 % du temps nécessaire pour que la première graine de la population germe. Les graines entières sont imbibées dans des boîtes de Petri contenant 2 papiers filtres saturés en eau, dans des incubateurs sous une lumière continue et aux températures indiquées dans le tableau II. Ces températures ont été choisi par le consortium européen.

Avant de procéder au dosage, les péricarpes des graines de tournesol sont ôtés et les axes embryonnaires coupés au scalpel. Cette opération permet de dissocier les tissus producteurs de ROS, les embryons, des cotylédons.

Les graines ou les embryons sont récoltés et incubés à l'obscurité pour une heure dans la solution de dosage de volume variable sous agitation constante à 25°C. La solution de dosage est composée de 10 mM de tampon phosphate pH 6.0 et 500 µM de sel de tetrazolium (XTT) comme Schopfer *et al.*, (2001) l'ont décrit. Le XTT est un composé jaune qui, en présence de superoxyde, donne un composé orangé : le formazan. L'augmentation de l'absorbance de la solution de dosage (due à l'accumulation de formazan) a été suivie à 470 nm par spectroscopie UV-visible (Uvikon XL Secomam). Le coefficient d'extinction du XTT est 24200 L mol⁻¹ cm⁻¹. Les blancs sont mesurés sans semences afin de corriger les changements d'absorbance non spécifiques au cours de l'incubation. Les volumes des essais sont optimisés pour chaque espèce afin d'obtenir une intensité du signal nécessaire aux mesures. Les résultats présentés sont la moyenne ± l'erreur type de 3 réplicats biologiques.

Les graines des projets nqr et air12 ont été stratifiées et imbibées dans d'autres conditions. Pour chaque échantillon, 20 mg de graines sont stratifiées pendant : 24 heures pour l'écotype Col et 72 heures pour l'écotype Ler. Ensuite les graines sont imbibées 24 heures pour les graines Col et 48 heures pour les graines Ler. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques (soit 6 réplicats au total). Le nombre de réplicats est doublé pour les semences d'écotype Col.

La production de superoxyde a aussi été suivie lors de l'interaction de AIR12, NQR et de fragments de membranes plasmiques d'hypocotyles de soja. Chaque essai contient 50 μ g de membrane plasmique de soja, 10 nM NQR, 10 nM AIR12, 200 μ M NADH, 500 μ M XTT et 20 mM de tampon Hepes pH 7.5. Les mesures sont effectuées dans une cuve en quartz de 1 mL par spectroscopie UV-visible (Uvikon XL Secomam). Les résultats présentés sont la moyenne de 4 répétitions \pm l'erreur standard.

2.6.1.2 Dosage de peroxyde d'hydrogène par spectroscopie à fluorescence

Les mêmes conditions de stratification et d'imbibition que pour le dosage de superoxyde sont appliquées. La solution de dosage est composée de 10 mM de tampon phosphate pH 6.0, 3 μ g/ml de peroxidase de raifort et 5 μ M de scopolétine (Schopfer *et al.*, 2001). La solution mère de scopolétine de concentration 10 mM est préparée dans de l'acide acétique glaciale et la solution de scopolétine. La scopolétine est un fluorophore (longueur d'onde d'excitation : 346 nm, longueur d'onde d'émission : 455 nm) qui, en présence de peroxyde d'hydrogène, forme un composé non fluorescent. La diminution de la fluorescence de la solution de dosage est mesurée grâce à un spectromètre à fluorescence (Cary Eclipse). Une courbe linéaire de calibration est faite à partir d'une solution commerciale de peroxyde d'hydrogène de concentration connue. Ainsi, les mesures de fluorescence des échantillons ont pu être converties en concentration molaire de peroxyde d'hydrogène. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques (soit 6 réplicats au total) de 20 mg de semences. Le nombre de réplicats est doublé pour les semences d'écotype Col.

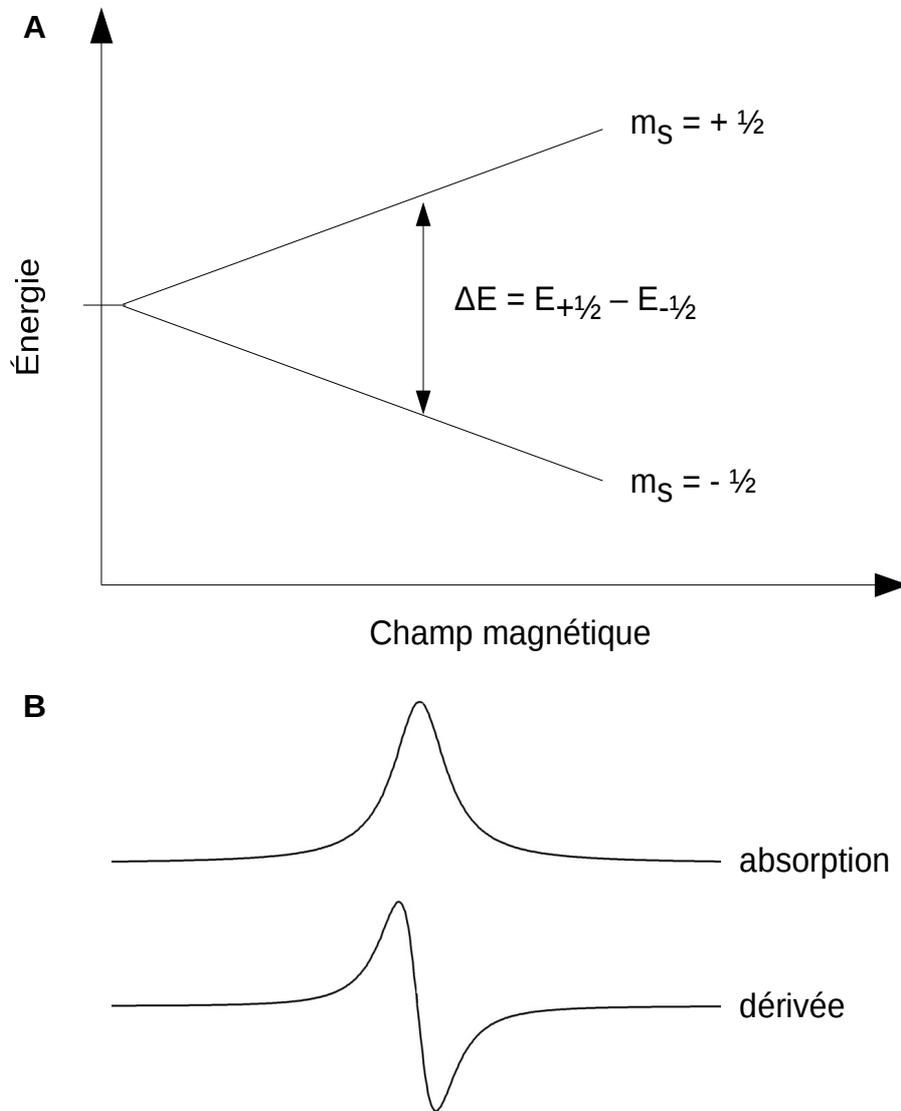


Figure 16 : (A) principe d'une transition d'état en RPE, (B) signal d'absorption typique mesuré et sa dérivée.

2.6.1.3 Dosage du radical hydroxyl par RPE

La spectroscopie à résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique qui permet la détection de molécules ou atomes possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Ainsi, cette technique permet d'étudier des ions métalliques de métalloprotéines et des molécules de type radicaux libres.

Un électron possède un spin et moment magnétique (m_s). En présence d'un champ magnétique externe, les deux états de spin possibles de l'électron ont des énergies différentes. L'état de basse énergie se produit lorsque le moment magnétique de l'électron est aligné de façon parallèle au champ magnétique ($m_s = -\frac{1}{2}$) et l'état de haute énergie lorsque le moment magnétique est aligné de façon antiparallèle ($m_s = +\frac{1}{2}$). La technique de RPE consiste à mesurer la différence d'énergie ΔE qui conduit à la transition entre ces deux états. Expérimentalement, une onde électromagnétique micro-onde (GHz) d'intensité constante est envoyée sur l'échantillon et un champ magnétique d'intensité croissante est appliqué grâce à un aimant contenu dans le spectroscope. Le signal obtenu est un spectre d'absorption. Pour des raisons techniques, le spectroscope affiche la première dérivée de ce signal (figure 16).

Le radical hydroxyl a une durée de vie courte car il réagit rapidement avec d'autres molécules. De ce fait il est nécessaire de le mesurer de façon indirecte en utilisant un spin trap. Un spin trap est un composé qui réagit avec le radical pour donner un produit plus stable que l'on peut détecter par RPE. Le spin trap utilisé pour détecter le radical hydroxyl est le α -(4-Pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron (POBN). Le radical stable détecté est un dérivé nitrosyle. Les mesures sont effectuées à température ambiante.

La solution de dosage contient 10 mM de tampon phosphate pH 6.5, 50 mM de POBN et 4 % d'éthanol. Dans le cadre du projet ECOSEED, les axes embryonnaires de 20 graines sèches de tournesol sont incubés dans cette solution (volume total 1 ml) pendant 1 heure sous agitation et à température ambiante. Les mesures sont effectuées sur le surnageant par RPE (ESP-300 X-band, Bruker, Rheinstetten, Allemagne).

Dans le cadre du projet air12, des plantules de 5 jours sont incubées dans 500 μ l de solution de dosage pendant 3 heures à température ambiante sous agitation continue. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats biologiques de 18 plantules.

2.6.2 Activité d'enzymes anti-oxydantes

Le protocole de culture des plantules est le même que celui utilisé pour mesurer la croissance des racicules. Au bout de 7 jours, 60 à 90 plantules sont prélevées. Les parties aériennes et racinaires sont séparées puis broyées sous azote liquide dans du tampon 50 mM Hepes pH 7.0. Les broyats sont ensuite centrifugés à 6 000 g pendant 10 minutes afin de se débarrasser des débris cellulaires et de ne garder que les protéines solubles. Les protéines totales sont dosées par la méthode de Bradford pour les échantillons non chlorophylliens (parties racinaires) ou par de l'amidoblack pour les échantillons contenant de la chlorophylle (parties aériennes et plantules entières). Trois répétitions biologiques et 2 répétitions techniques sont mesurées pour chaque génotype.

2.6.2.1 Catalase

L'activité catalase est mesurée grâce à une électrode à oxygène en phase liquide (Hansatech Instruments, Norfolk, England). Elle est composée d'une cathode en platine et d'une anode circulaire en argent. Le pont salin est une solution de 3 M KCl recouvert d'une membrane de teflon perméable à l'oxygène. La cuve de mesure est placée au dessus de l'électrode et chaque essai contient 50 mM tampon Hepes pH 7.0, 1 mM H₂O₂ et 5 à 10 µg/ml de protéines totales. Le volume final est de 500 µl. La solution est agitée à l'aide d'un barreau aimanté et maintenue à 20°C.

La mesure de référence est effectuée grâce à de l'eau sous atmosphère normale (284 µmol d'O₂/ l à 20°C) puis quelques grains de dithionite sont ajoutés pour mesurer le signal sans oxygène.

2.6.2.2 Superoxyde dismutase

Chaque essai contient du tampon 20 mM Hepes pH 7.0, 50 µM xanthine, 100 µM XTT, 0.2 U/ml xanthine oxydase et 5 à 10 µg/ml d'extrait protéique. La xanthine est d'abord diluée dans du NaOH puis de l'eau déminéralisée est ajoutée en conservant un pH < 12.0. Le

volume total est de 1 ml. Les mesures sont réalisées à température ambiante à 470 nm en spectroscopie UV-visible pendant 5 minutes. Le coefficient d'extinction du XTT est 24200 L mol⁻¹ cm⁻¹.

2.6.2.3 Guaiacol peroxydase

Chaque essai contient du tampon 50 mM citrate NaOH pH 5.0, 8.3 mM guaiacol, 8.8 mM H₂O₂ et 5 à 30 µg/ml de protéines totales à température ambiante. Les mesures sont réalisées à température ambiante à 470 nm en spectroscopie UV-visible pendant 5 minutes. Le coefficient d'extinction du tétraguaiacol est 26600 L mol⁻¹ cm⁻¹.

2.7 Production de la protéine recombinante NQR chez *E.coli*

2.7.1 Milieux de culture des bactéries

Le milieu liquide LB (Luria-Bertani) est composé de 10 g/l de peptone, 5 g/l d'extrait de levure, 10 g/l de NaCl et d'eau déminéralisée. Le milieu est autoclavé pendant 20 minutes à 120°C. Pour obtenir un milieu solide, 15 g/l d'agar sont ajoutés avant le passage à l'autoclave. Le milieu de culture enrichi TB (Terrific Broth) est composé de 12 g/l de tryptone, 24 g/l d'extrait de levure, 0.4 % de glycérol, 17 mM KH₂PO₄ et 72 mM K₂HPO₄ et d'eau déminéralisée.

2.7.2 Transformation par choc thermique

Le plasmide pET28-AtNQR a été fourni par l'équipe de P.Trost (université de Bologne, Italie). La transformation est faite dans des bactéries super compétentes commerciales BL21 (DE3) (Agilent Technologies). Les cellules compétentes (25 µl) sont incubées 10 minutes dans la glace en présence de β- mercaptoethanol (1 µl). Après l'ajout de 0,5 µl de plasmide pET28-AtNQR, les cellules sont incubées 20 minutes dans la glace. Le

choc thermique est appliqué pendant 1 minute à 42°C, puis les cellules sont de nouveau incubées 2 minutes dans la glace avant l'ajout de 250 µl de milieu LB additionné de 12.5 mM MgCl₂, 12.5 mM MgSO₄ et 10 mM glucose. La culture est ensuite incubée pendant 1 heure à 37°C sous agitation continue, puis étalée sur boîte de Petri contenant du milieu LB solide additionné de 50 µg/ml de kanamycine et placée pendant la nuit à 37°C.

2.7.3 Expression hétérologue de AtNQR

Une pré-culture à partir d'une colonie *E.coli* contenant le plasmide pET28-AtNQR est faite sur la nuit à 37°C dans 50 ml de milieu LB additionné de 50 µg/ml de kanamycine sous agitation continue. La pré-culture est ensuite diluée dans 500 ml de milieu TB additionné de 50 µg/ml de kanamycine à 37°C jusqu'à l'obtention au bout de 2 heures de DO₆₀₀ = 1. L'expression du plasmide d'intérêt est ensuite induite grâce à 0.25 mM d'isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG) et 2 % d'éthanol. L'induction se fait à 25°C pendant la nuit. Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation à 6000 g pendant 10 minutes à 4°C et resuspendues pour être rincées avec le tampon de lyse (40 mM Tris pH 8.0, 10 % glycerol, 300 mM NaCl) puis centrifugées dans les mêmes conditions. Le culot est congelé à -20°C.

Le culot est resuspendu dans le tampon de lyse et un cocktail d'anti-protéase est ajouté (1 mM EDTA, 1 mM PMSF, DNase, 1 mM acide caproïque, 1 mM benzamidine). Les cellules sont ensuite cassées à température ambiante dans une presse de French à 800 psi. Une centrifugation de 30 minutes à 16000 rpm et 4°C permet de se débarrasser du culot contenant les débris cellulaires restants. Le surnageant contient les protéines solubles dont AtNQR.

2.8 Purification de la protéine recombinante AtNQR

La protéine AtNQR possède une étiquette à 6 histidines qui va permettre sa purification sur une résine d'affinité au nickel (résine Ni-Probond, Invitrogen). Après avoir déposé les protéines solubles sur la colonne, l'éluion est effectuée avec des concentrations croissantes d'imidazole : 15 mM, 60 mM et 300 mM. Une fraction jaune vif est éluée à 300 mM et est identifiée comme étant AtNQR du fait de son cofacteur flavine. Afin d'éliminer

l'imidazole, une dialyse de cette fraction a lieu pendant la nuit dans du tampon 40 mM Tris pH 8.0 à 4°C. L'extrait est ensuite concentré sur filtre Amicon YM10 à 5000 g pendant 30 minutes à 4°C. Pour débarrasser l'échantillon des protéines précipitées il est centrifugé à 7500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est stocké à -80°C.

2.9 Caractérisation du cofacteur de NQR

2.9.1 Spectres de réduction de NQR

Les spectres d'absorbance de NQR sont mesurés en spectroscopie UV-visible dans une cuve en quartz de volume 500 µl et de trajet optique 1 cm. La cuve contient 7.5 µM NQR et du tampon 20 mM Hepes pH 7.5. NQR est réduit dans la même cuve grâce à quelques graines de dithionite de sodium.

2.9.2 Fluorescence du FMN libre après dénaturation de NQR

Pour déterminer la stœchiométrie du FMN par rapport à NQR dans l'échantillon, NQR est dénaturé selon le protocole Aliverti *et al.*, (1999). Cette étape a pour objectif la libération du FMN initialement lié à l'enzyme. 1 µM NQR dans du tampon 20 mM Hepes pH 7.5 est dénaturé par 0.2 % SDS, puis l'échantillon est centrifugé à 45000 g pendant 30 minutes à 4°C pour se débarrasser du précipitat opaque formé. La fluorescence du surnageant est ensuite mesurée par un fluorimètre (Cary Eclipse, Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis) dans une cuve en quartz de 120 µl de volume. La longueur d'onde d'excitation est 450 nm et un spectre d'émission est mesuré entre 470 et 600 nm. Afin de relier cette fluorescence à une concentration de FMN, une gamme de référence est effectuée grâce à du FMN commercial. Les mesures de fluorescence sont effectuées dans la même cuve et avec le même tampon que les mesures de NQR dénaturé. Les concentrations de FMN ajoutées vont de 40 nM à 1,25 µM. Les maximums de fluorescence sont relevés et reportés sur une droite étalon.

2.9.3 Titration du FMN par fluorescence en présence de NQR

La reconstitution du complexe NQR-FMN est suivie en spectroscopie à fluorescence dans les mêmes conditions que pour la fluorescence du FMN libre. Une cuve en quartz de 500 μl de volume est utilisée. Dans un premier temps, 3 μM de FMN est ajouté dans du tampon 20 mM Hepes pH 7.5. Dans un second temps, des concentrations croissantes de NQR sont ajoutées allant de 0.5 à 11 μM .

Les maximum de fluorescence sont relevés et reportés sur une droite étalon. La courbe de meilleur ajustement permettant de déterminer le coefficient de dissociation de FMN et NQR (K_d) est effectué par le solveur d'Excel (Microsoft).

2.9.4 Mesure de l'activité

Les quinones utilisées pour les mesures d'activité sont la 1,4-benzoquinone (BQ), la 1,4-naphtoquinone (NQ), la ménadione ou 2-méthyl NQ, l'Ubiquitine-0 ou 2,3-diméthoxy 5-méthyl BQ. Chaque essai contient 0.2 mM NADH, 0.2 mM quinone, 0.2 $\mu\text{g/ml}$ NQR et du tampon 20 mM Hepes pH7.5.

Chaque essai contient du tampon Hepes 20 mM pH 7.5, 200 μM nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), 200 μM Ub-0), 5 à 250 nM FMN et 5 nM NQR. Afin de garantir la stabilité du NADH, la solution est préparée d'après les recommandations de Wu *et al.*, (1986) et Rover *et al.*, (1998) : absence de sels dans le tampon, $\text{pH} \geq 7.5$, température $< 25^\circ\text{C}$. Ainsi, le NADH est dissous dans du tampon Hepes 20 mM pH 7.5 et maintenu dans la glace. Les quinones comme Ub-0 sont peu solubles dans l'eau c'est pourquoi Ub-0 est d'abord dissous dans du DMSO à 100 mM puis dilué dans le tampon de l'essai. La vitesse est mesurée pendant 2 minutes en suivant l'absorbance du NADH à 340 nm en spectroscopie UV-visible. Le coefficient d'extinction du NADH est $6230 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ l}$.

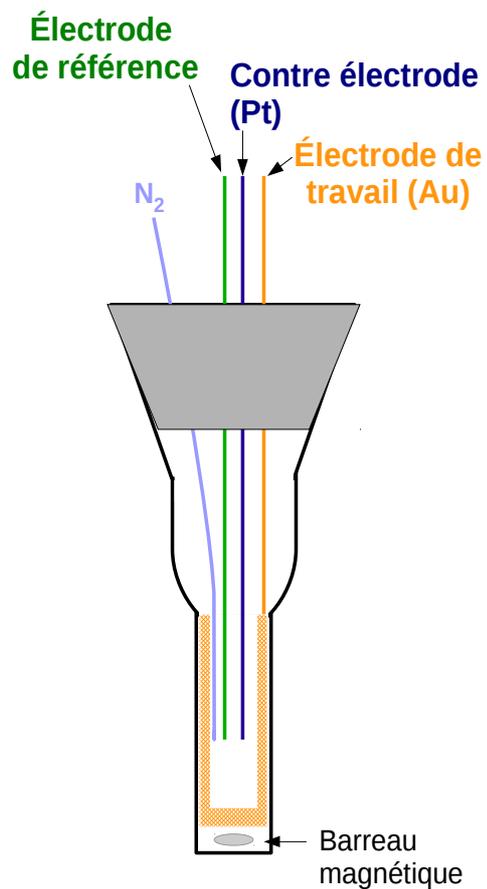


Figure 17 : Schéma de la cellule électrochimique vue dans le sens du trajet optique.

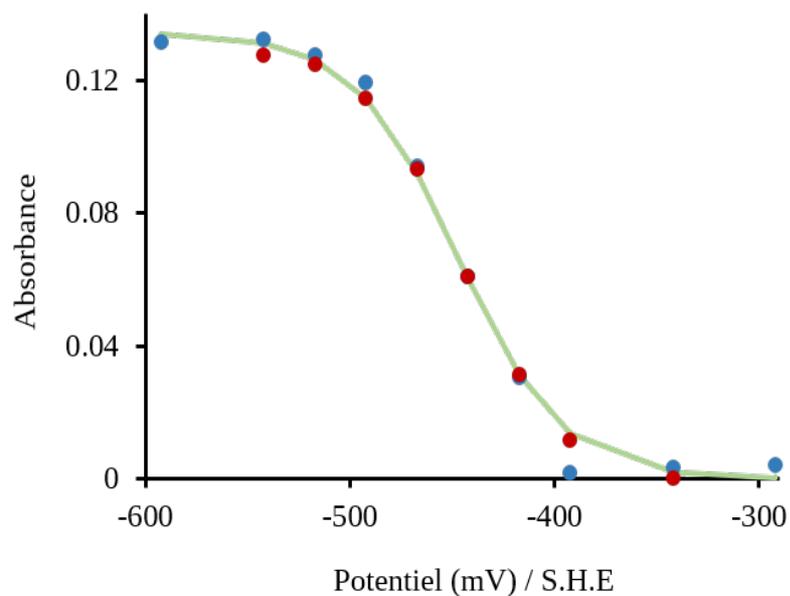


Figure 18 : Titration rédox du méthylviologène à pH 7.5. Les points représentent les maximums d'absorption à 446 nm, en bleu dans le sens de l'oxydation et en rouge dans le sens de la réduction. La courbe verte est une simulation de l'équation de Nernst.

2.10 Electrochimie : titration rédox

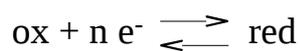
La cellule électrochimique utilisée (figure 17) appartient au Dr. Jérôme Santolini (équipe « Stress oxydant et détoxication », I2BC). L'électrode de travail est une grille d'or fixée sur une structure de polyméthylméthacrylate. La contre électrode est constituée d'un fil de platine isolé par un pont salin. L'électrode de référence est une microélectrode Ag/AgCl/KCl 3M (DriRef 2, World Precision Instruments) de potentiel +208 mV par rapport à l'électrode standard à hydrogène (SHE). L'ensemble de cette structure est plongé dans une cuve en quartz de volume 2.5 ml contenant un barreau aimanté. La cuve est fermée par un bouchon en caoutchouc qui garantit son étanchéité et un flux d'azote balaye la cuve en continu afin de limiter la pénétration d'oxygène. Toutes les électrodes sont reliées au potentiostat. Le potentiostat permet à l'expérimentateur d'imposer un potentiel électrique au système. Un spectromètre d'absorption (Uvikon XL, Secomam) permet de suivre l'état d'oxydo-réduction. Toutes les titrations sont faites dans du tampon 30 mM Hepes 100 mM KCl pH 7.5.

Les solutions contenant l'espèce à titrer sont déoxygénées pendant environ 5 minutes sous argon. Le système s'équilibre initialement en 45 minutes.

2.10.1 Titration du méthylviologène

Le méthylviologène est titré pour contrôler le fonctionnement du système. La cuve contient 10 μM méthylviologène. L'absorbance est suivie à 446 nm et les maximums sont reportés en figure 18. La courbe expérimentale a été simulée à l'aide de l'équation de Nernst (figure 19).

Pour le méthylviologène, le nombre d'électrons est égal à 1. Dans la littérature, les potentiels rédox du méthylviologène mesurés sont -446 mV pour Mayhew, (1978) et -440 mV pour Wilson *et al.*, 1970. Dans le cas de ma titration le potentiel redox mesuré est de -449 mV ce qui est très proche des valeurs citées. Le dispositif de titration est donc valide.



$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]}$$

Figure 19: Equation de Nernst pour une réaction d'oxydoréduction à n électrons (e^-) entre la forme oxydée (ox) et la forme réduite (red) d'un couple rédox en solution. E (V) : le potentiel de la solution, E_0 (V) : le potentiel de demi-vague du couple ox/ red, R : la constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T : la température (K) et F : la constante de Faraday (96485 C mol^{-1}).

Tableau III : Liste des médiateurs utilisés pour la titration de FMN et NQR avec leur potentiel redox et leur concentration finale.

Médiateurs	E_0 / SHE (mV)	Concentration (μM)
ménadione	0	1
2,5- dihydroxy-p-benzoquinone	-60	2
anthraquinone	-100	2
Indigo carmine	-125	2
Anthraquinone-1,5-disulfonate	-170	2
Anthraquinone-2-sulfonate	-225	2
phénosafranine	-252	1
Safranine T	-289	1
benzylviologène	-350	1
méthylviologène	-440	1

2.10.2 Titration du FMN

Afin de faciliter les transferts d'électrons, des médiateurs sont ajoutés dans la cuve (tableau II) qui contient aussi 50 μM de FMN. L'absorbance est suivie à 446 nm. La titration débute par la réduction complète du FMN et se poursuit par l'oxydation progressive. L'oxydation qui n'a pas pu être terminée du fait de sa lenteur. Cependant, une estimation du potentiel rédox a pu être faite à -212 mV.

2.10.3 Titration de NQR

La cuve contient les médiateurs (tableau III), 110 μM NQR. L'absorbance est suivie à 450 nm. La titration débute par la réduction complète de NQR et se poursuit par l'oxydation progressive. En fin d'oxydation, la solution protéique était trouble, NQR a précipité.

2.11 Cinétique d'oxydation du MDH₂ en présence de AIR12

Les changements d'absorbance sont suivis grâce à un spectromètre à diode (Specord S600, Analytik Jena, Germany). Chaque essai contient 200 μM MDH₂, du tampon 20 mM MES à pH 6.55 ou 5.8 ou du tampon 20 mM Hepes pH 8.0, 40 nM AIR12.

2.12 Analyse des données

Les simulations des parties (titration du FMN lié à NQR et simulation équation de Nernst pour titrations redox) sont faites grâce au module de calcul d'Excel « Solveur » (Microsoft). Pour toutes les autres données, les analyses et statistiques (test t de Student, les différences par rapport au sauvage sont indiquées par des étoiles ou une ANOVA suivie d'un test de Tukey, les groupes statistiques sont indiqués par des lettres) sont faites par le logiciel R.

3. Evaluation de la qualité des graines : projet ECOSEED

3.1 Introduction

L'objectif de cette partie est de doser les radicaux présents dans des semences de 4 espèces (*Helianthus annuus*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleracea* et *Hordeum vulgare*) produites par des plantes ayant subi des stress thermique et/ou hydrique lors de la maturation des graines. Ce travail s'inscrit dans le projet européen ECOSEED qui a pour but l'étude de la qualité des graines dans un contexte de réchauffement climatique. Les effets du vieillissement sont aussi étudiés. L'accent est mis sur la production de ROS ainsi que leurs effets au niveau des protéines, des acides nucléiques et des lipides. Mon rôle a été de doser le O_2^- dans les graines afin de voir si le stress appliqué à la plante mère induit une production de ROS anormale chez les graines. J'ai aussi collaboré avec Sun Un (CEA Saclay) pour les mesures de radicaux par résonance paramagnétique électronique (RPE) à haut champ. La RPE à haut champ permet de mesurer et d'identifier les radicaux. Cette technique semble un outil prometteur pour détecter des radicaux qui pourraient servir de marqueur de qualité dans les graines.

Toutes les mesures présentées sont faites sur des graines sèches, des graines imbibées de façon précoce ou tardive. Les points d'imbibition sont différents pour les 4 espèces de graines étudiées et ont été choisis par le consortium européen. L'imbibition précoce est définie comme la fin de la phase I d'absorption d'eau. L'imbibition tardive est définie à 80 % du temps nécessaire pour que la première graine de la population germe.

Le traitement de détérioration contrôlé (CDT) est effectué en laboratoire à 75 % d'humidité relative et 40°C et la durée est variable pour chaque espèce de graines (voir Matériels et Méthodes). Le CDT vise à reproduire les effets du vieillissement naturel des semences.

3.2 *Helianthus annuus*

Deux génotypes sont étudiés : B qui correspond à un hybride C18:3 pauvre en acides gras et C, un hybride C18:1 riche en acides gras. Les plantes cultivées dans des conditions

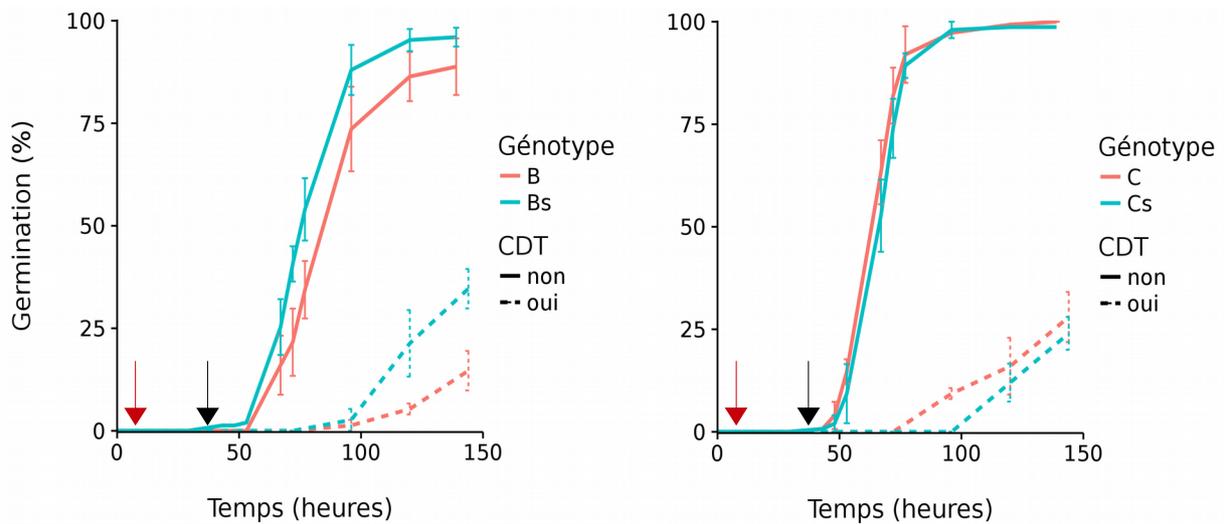


Figure 20 : Tests de germination à 15°C en lumière continue de graines de *H.annuus* issues de plantes contrôles (B et C) ou ayant subi un stress hydrique (Bs et Cs, 3 semaines d'arrêt d'arrosage avant la récolte) et ayant été soumises à des traitements de détérioration contrôlée (CDT). La flèche rouge indique le point d'imbibition précoce des graines à 6 heures et la flèche noire le temps d'imbibition tardive à 38 heures. Les moyennes de 3 répétitions (n = 25) ± l'erreur-standard sont exprimées. Les tests ont été réalisés par les partenaires de l'UPMC.

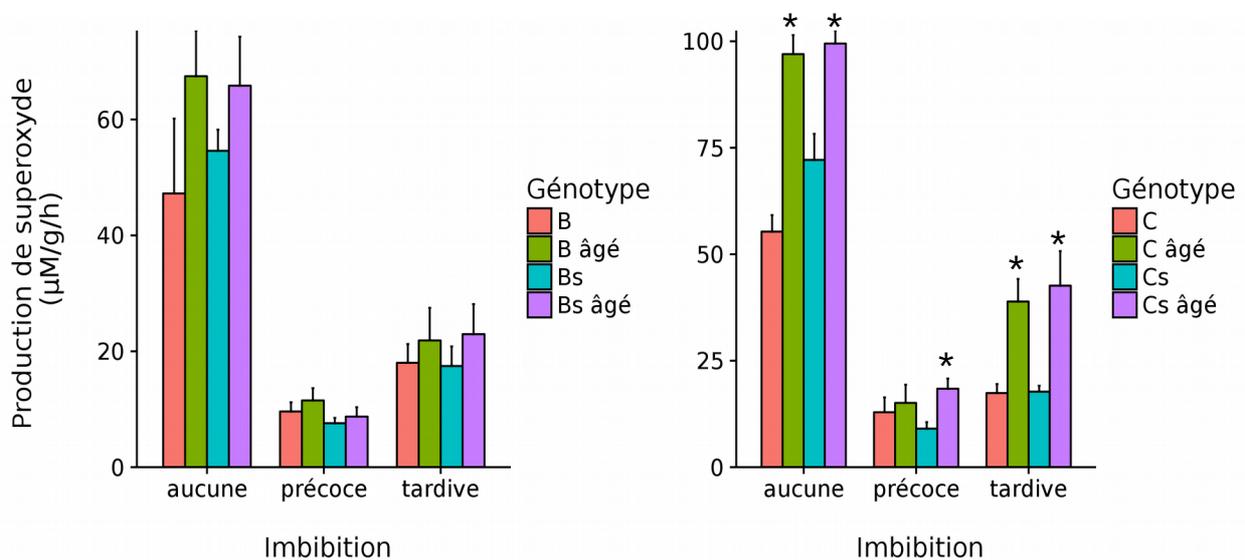


Figure 21 : Dosage de superoxyde sur des axes embryonnaires de *H.annuus* issues de plantes contrôles (B et C) ou stressées (Bs et Cs), soumises à des traitements de détérioration contrôlée (âgé) et non imbibée ou imbibée à 15°C de façon précoce (6 heures) ou tardive (38 heures). Les moyennes de 4 répétitions (n = 10) ± l'erreur-standard sont exprimées. Les * indiquent des différences statistiques à P < 0.05. Les tests statistiques sont toujours effectués au sein de graines ayant été imbibées dans les mêmes conditions et en comparaison avec les graines n'ayant pas subi de CDT.

contrôle (B et C) sont irriguées deux fois plus que les plantes en stress hydrique (Bs et Cs) lors de la phase de remplissage des graines. Le CDT a été appliqué 21 jours sur chaque groupe de graines (appelées graines traitées, vieilles ou âgées).

3.2.1 Germination

Les tests de germination ont été réalisés par nos partenaires de l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC). Les semences non traitées montrent une faible vigueur étant donné que les semences germent totalement après 6 jours d'imbibition (figure 20). Les graines de génotype C germent plus rapidement que les graines de génotype B. Le stress a peu d'effet sur la germination des semences non traitées C tandis que les graines Bs germent un peu plus rapidement que les graines B non traitées. Le traitement de détérioration contrôlée induit une perte de vigueur ainsi qu'une perte de viabilité de 50 %. Les semences traitées Bs semblent mieux supporter le vieillissement que les graines B.

3.2.2 Production de superoxyde dans des graines sèches et imbibées

Les dosages de $O_2^{\cdot-}$ sont effectués sur les embryons de graines de tournesol (figure 21). Les temps d'imbibition de graines utilisés sont de 6 heures pour l'imbibition précoce et de 38 heures pour l'imbibition tardive, ils sont indiqués par des flèches sur les courbes de germination (figure 20). Globalement, les embryons secs produisent environ 6 fois plus de $O_2^{\cdot-}$ que les graines à imbibition précoce et 3 fois plus que les semences à imbibition tardive. Chez les graines de génotype B, il n'y a pas de différences statistiques entre les graines stressées et/ou âgées. Les semences C âgées montrent une production de $O_2^{\cdot-}$ significativement accrue par rapport aux semences non âgées. Cependant, les semences stressées produisent autant de $O_2^{\cdot-}$ que les semences contrôle qu'il y ait vieillissement ou non.

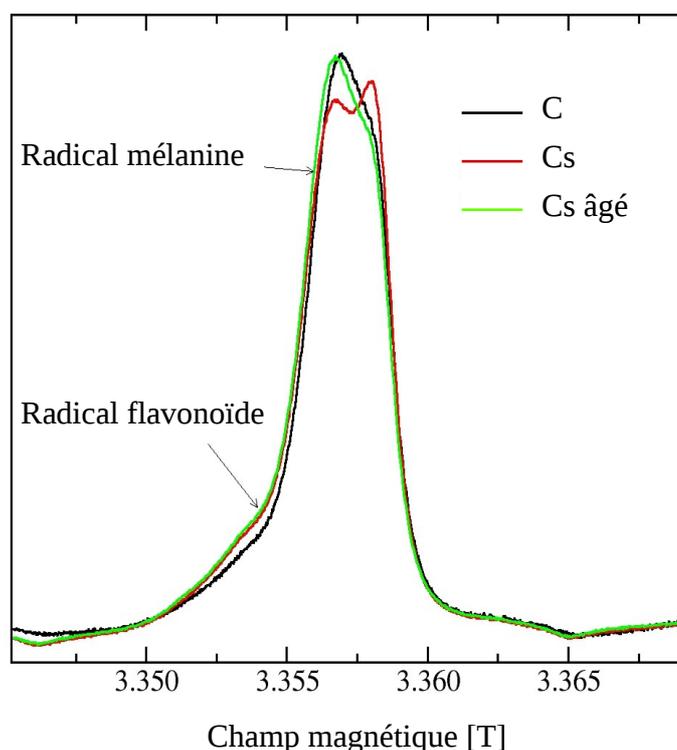


Figure 22 : Détection des radicaux par RPE haut champ (95 GHz) dans des péricarpes broyés de graines sèches d'*H.annuus*. C correspond aux graines de génotype C, Cs aux graines de génotype C issues de plantes stressées et âgé correspond aux graines ayant été soumise à la CDT.

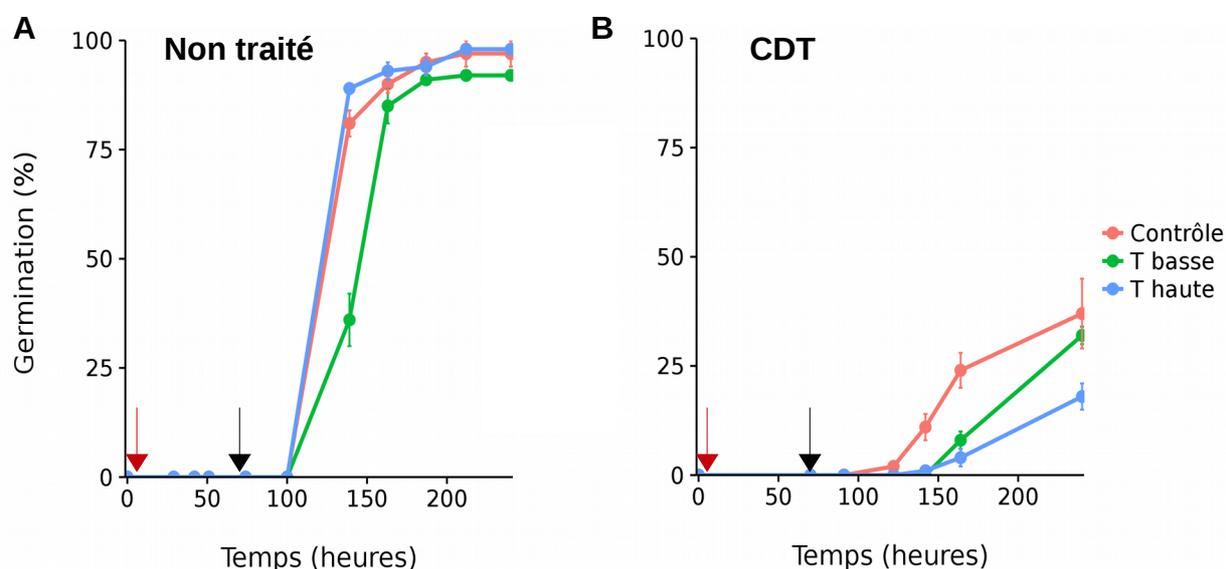


Figure 23 : Tests de germination à 10°C en lumière continue de graines d'*A.thaliana* issues de plantes contrôles (22°C/18°C) ou ayant subi un stress thermique (T haute pour température haute (28°C/25°C) et T basse pour température basse (16°C/14°C)). (A) Les semences n'ont pas été soumise au CDT contrairement à (B). La flèche rouge indique le point d'imbibition précoce des graines à 6 heures et la flèche noire le temps d'imbibition tardive à 72 heures. Les moyennes de 3 répétitions (n = 40) ± l'erreur-standard sont exprimées. Les tests ont été réalisés par les partenaires de l'UPMC.

3.2.3 Les radicaux mesurés par RPE à haut champ

Les graines ont été disséquées de façon à en isoler toutes les parties : le péricarpe, l'enveloppe, les cotylédons et l'embryon. Les mesures de RPE haut champ ont donc été faites indépendamment sur chaque tissu. Le péricarpe est le seul tissu dans lequel des radicaux ont pu être détectés. La figure 22 montre les signaux obtenus à partir des échantillons de péricarpe de graines C. Le radical qui montre un signal important est dû à la mélanine et l'épaulement à un radical flavonoïde. Que les péricarpes soient issus de semences stressées ou vieilles les signaux sont semblables. Les signaux obtenus pour les semences B sont identiques.

3.3 *Arabidopsis thaliana*

Les plantes d'*A.thaliana* étudiées sont toutes de génotype sauvage (WT) et d'écotype Columbia. Toutes les plantes sont cultivées en conditions de jours longs : 16 heures en présence de lumière et 8 heures à l'obscurité en conditions contrôle à 22°C/18°C (respectivement, températures de la période lumineuse / période d'obscurité). Lorsque les premières graines commencent à se développer, certaines plantes sont mises en culture en conditions de stress thermique : 16°C/14°C (températures basses : T basse), et 28°C/25°C (températures hautes : T haute. Le CDT a été appliqué 7 jours sur chaque groupe de graines.

3.3.1 Germination

Les tests de germination ont été réalisés par nos partenaires de l'UPMC. Les semences non traitées issues de plantes contrôle ou ayant subi un stress thermique chaud germent de la même façon (figure 23 A). Les graines issues de plantes ayant subi un stress thermique froid germent légèrement plus lentement que le contrôle mais la germination est optimale au bout de 6 jours également. Chez les graines soumises au CDT, une perte de vigueur et une perte de viabilité sont observées (figure 23 B). Les semences soumises à des températures hautes sont plus sensibles au CDT que les graines contrôle tandis que les graines de stress froid montrent un phénotype intermédiaire.

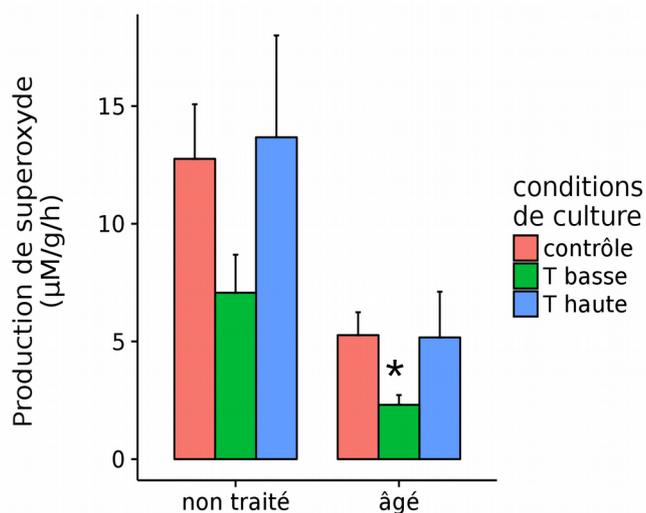


Figure 24 : Dosage de superoxyde sur des graines d'*A.thaliana* imbibées 72 heures (imbibition tardive) issues de plantes cultivées dans différentes conditions : contrôle (22°C/18°C), température (T) basse 16°C/14°C) et température haute (16°C/14°C) fraîches ou soumises au CDT (non traité ou âgé). Les moyennes de 4 répétitions (n = 20 mg) \pm l'erreur-standard sont exprimées. * indique des différences statistiques à $P < 0.05$ entre les graines âgées contrôle et T basse.

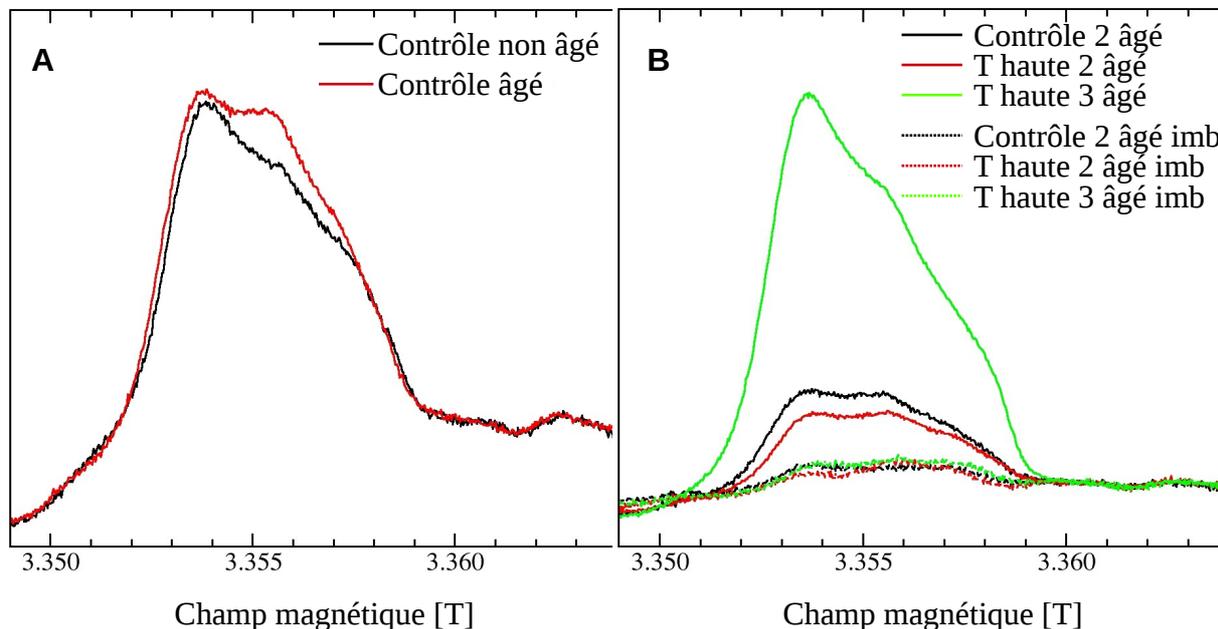


Figure 25 : Détection des radicaux par RPE haut champ (95 GHz) dans des graines d'*A.thaliana* contrôle fraîches (non âgé) ou soumises au CDT (âgé). (A) Les graines sont sèches. Les spectres représentent la moyenne de 3 répétitions biologiques. (B) Les graines sont sèches ou imbibées (imb) issues de plantes contrôle (22°C/18°C) ou ayant subi un stress thermique chaud (T haute : 28°C/25°C) et soumise au CDT (âgé).

3.3.2 Le superoxyde dans des graines sèches et imbibées

Les temps d'imbibition de graines utilisés sont de 6 heures pour l'imbibition précoce et de 72 heures pour l'imbibition tardive, ils sont indiqués par des flèches sur les courbes de germination (figure 23).

Les mesures de production de O_2^- ont été impossibles à faire sur des semences sèches et imbibées précocement. Il est possible que le mucilage ou les composés phénoliques de l'enveloppe interfèrent avec le XTT. D'après Debeaujon *et al.*, 2000, ce problème technique est attendu car le XTT ne pénètre pas dans l'enveloppe des graines d'*A.thaliana*. Ce problème a également été rencontré par les partenaires de l'UPMC lors des dosages de H_2O_2 par la méthode de la scopolétine. De ce fait, des mesures ont été faites uniquement sur les semences à imbibition tardive (figure 24). La production de O_2^- est 2 à 3 fois plus faible chez les semences vieilles que chez les graines fraîches. Les graines issues de la culture à température haute produisent autant de O_2^- que les contrôles que les semences soient vieilles ou non. Les semences issues de plantes soumises à des températures basses montrent une réduction d'un facteur 2 de la production en O_2^- . Ces observations sont valables pour les graines fraîches et vieilles.

3.3.3 Les radicaux mesurés par RPE à haut champ

La figure 25 A montrent les signaux obtenus par RPE à partir d'échantillons de graines sèches contrôle fraîches ou vieilles. Les signaux sont quasiment identiques et le radical identifié est un flavonoïde : l'épi-catéchine (pour plus de détails sur l'identification de l'épi-catéchine voir annexe, article 2). Les graines sèches issues d'une culture à température élevée montrent des signaux d'amplitude différente, la répétition 3 a un signal accru d'un facteur 5 par rapport à la répétition 2 (figure 25 B). Mis à part ce signal particulier, les semences issues de culture contrôle ou de culture aux températures basse et haute ont une concentration de catéchine semblable aux plantes contrôles vieilles ou non. Le radical flavonoïde présent dans les semences sèches décroît rapidement lors de l'imbibition chez toutes les semences indépendamment des conditions de culture ou de la CDT.

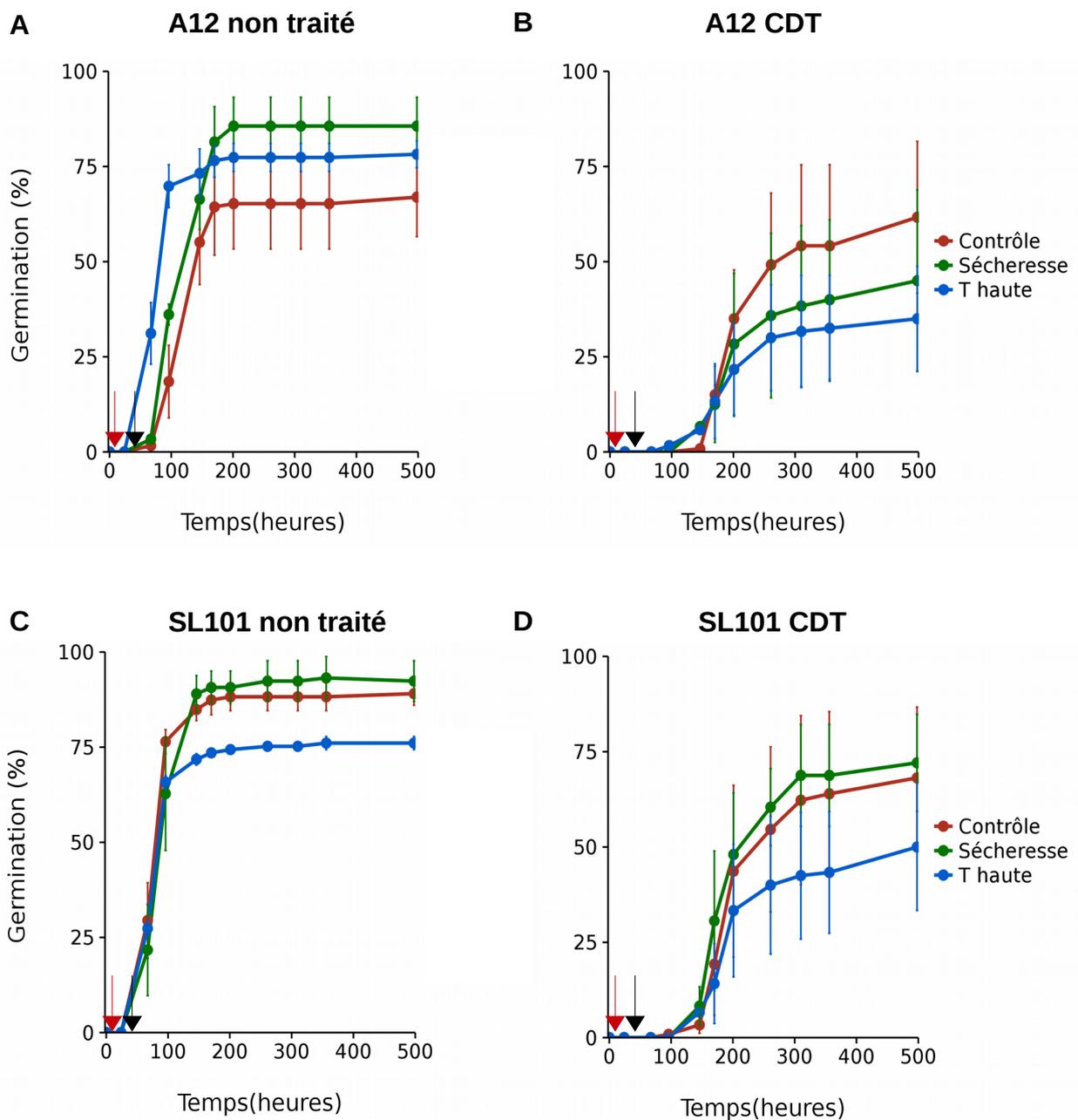


Figure 26 : Tests de germination à 10°C en lumière continue de graines de *B.oleracea* issues de plantes contrôles (22°C/18°C) ou ayant subi un stress hydrique (sécheresse 22°C/18°C, -0.1 Mpa) ou thermique (T haute pour température haute (31°C/25°C)). (A) Les semences de génotype A12 (faible vigueur) n'ont pas subi de CDT contrairement à (B). (C) Les semences de génotype SL101 (forte vigueur) n'ont pas subi de CDT contrairement à (D). La flèche rouge indique le point d'imbibition précoce des graines à 10 heures et la flèche noire le temps d'imbibition tardive à 40 heures. Les moyennes de 3 répétitions ± l'erreur-standard sont exprimées. Les tests ont été réalisés par les partenaires de l'IPK.

3.4 *Brassica oleracea*

Des semences de deux génotypes sont étudiées : A12Dhd (A12) et AGSL101 (SL101). Les graines génotypes A12 ont une vigueur inférieure aux semences SL101 d'après les partenaires du Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) les ayant produits et sélectionnés. Toutes les plantes sont cultivées en conditions de jours longs : 16 heures en présence de lumière et 8 heures à l'obscurité en conditions contrôles 22°C/18°C (jour/nuit). A la fin de la floraison, un tiers des plantes est transféré à 31°C/25°C, ce qui cause un stress thermique (températures hautes). Lorsque l'humidité relative dans les graines des plantes contrôle atteint 70 %, la moitié des plantes est soumise à un stress hydrique (dessiccation) à -1.0 MPa.

3.4.1 Germination

Les tests de germination ont été réalisés par nos partenaires de l'IPK (figure 26). La germination des semences fraîches contrôle montrent que la vigueur de A12 est plus faible que celle de SL101 (germination à 65 % vs 88 % au bout de 8 jours d'imbibition). Les semences vieilles des deux génotypes ayant poussé en conditions de stress hydrique montrent une germination légèrement plus rapide que le contrôle. Par contre il y a des différences au niveau des graines de température haute, pour le génotype A12, la germination à 8 jours est supérieure au contrôle et pour le génotype SL101 elle est inférieure. Les CDT induisent des pertes de vigueur des semences des deux génotypes. Chez A12, les graines contrôle sont moins affectées par le traitement que les graines stressées de façon thermique et hydrique (55 % vs environ 31 % et 38 %). Pour SL101, les tendances relatives entre les mutants sont conservées par rapport aux semences non traitées.

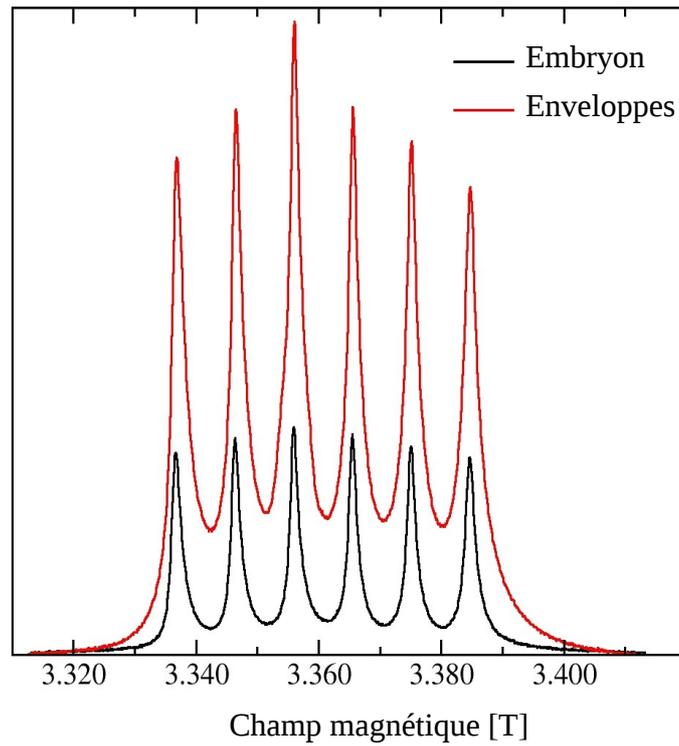


Figure 27 : Détection des radicaux par RPE haut champ (95 GHz) dans des graines de *B.oleracea* sèches contrôle broyées.

3.4.2 Le superoxyde dans des graines sèches et imbibées

Les temps d'imbibition de graines utilisés sont de 10 heures pour l'imbibition précoce et de 40 heures pour l'imbibition tardive, ils sont indiqués par des flèches sur les courbes de germination (figure 26).

Comme pour *A.thaliana*, les dosages n'ont pas été possibles chez *B.oleracea*. Il semblerait que les enveloppes soient imperméables au XTT que les semences soient sèches ou imbibées.

3.4.3 Les radicaux mesurés par RPE à haut champ

Les enveloppes ont été dissociées de l'embryon des graines puis les échantillons ont été broyés avant les mesures RPE. La figure 27 montre les spectres obtenus. Les signaux observés correspondent à du manganèse (II) associé à du phosphate. L'amplitude du signal est plus importante dans les enveloppes que dans l'embryon, signe que le radical y est présent en plus grande concentration.

3.5 *Hordeum vulgare*

Des semences de 2 génotypes sont étudiées : 2110 et 4710. Les graines HOR 2110 ont une durée de vie courte car seulement 2 % donnent des plantules normales tandis que pour les graines HOR 4710 ce taux s'élève à 94 %; elles ont donc une durée de vie longue selon nos partenaires de l'IPK. Toutes les plantes sont cultivées en conditions de jours courts : 8 heures en présence de lumière et 16 heures à l'obscurité en conditions contrôles 22°C/ 18°C (jour/nuit). Sept jours après la floraison, une partie des plantes est transférée en conditions de stress : thermique 28°C /25°C (températures hautes) ou hydrique (sécheresse).

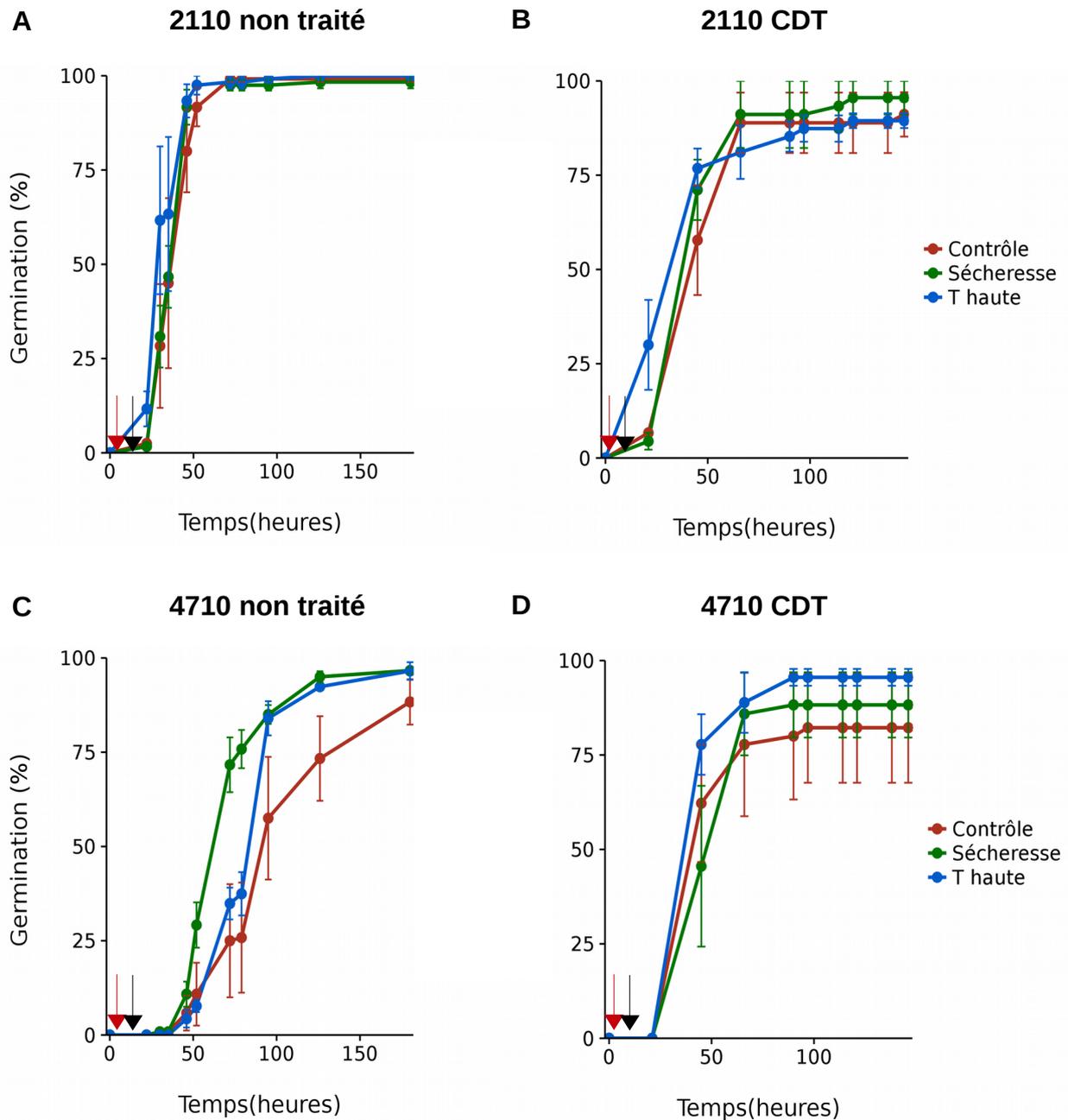


Figure 28 : Tests de germination à 20°C en présence de 8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité de graines de *H.vulgare* issues de plantes contrôles (22°C/18°C) ou ayant subi un stress hydrique (sécheresse 22°C/18°C, -0.1 Mpa) ou thermique (T haute pour température haute (25°C/28°C)). (A) Les semences de génotype 2110 (faible stockabilité) n'ont pas subi de CDT contrairement à (B). (C) Les semences de génotype 4710 (forte stockabilité) n'ont pas subi de CDT contrairement à (D). La flèche rouge indique le point d'imbibition précoce des graines à 10 heures et la flèche noire le temps d'imbibition tardive à 40 heures. Les moyennes de 3 répétitions (n = 35) ± l'erreur-standard sont exprimées. Les tests ont été réalisés par les partenaires de l'IPK.

3.5.1 Germination

Les tests de germination ont été réalisés par nos partenaires de l'IPK. Les semences de génotype 2110 non vieilles, montrent une germination optimale au bout de 2 jours quelque soit le stress qui a été appliqué à la plante mère. La CDT induit une légère perte de vigueur. Chez les semences de génotype 4710 non vieilles, la germination est plus rapide par rapport au génotype 2110. Au bout de 4 jours, la germination des semences contrôle atteint 57 % contre 85 % pour les semences ayant subi un stress. La CDT induit une augmentation de la germination des 3 lots de semences.

Les temps d'imbibition de graines utilisés sont de 10 heures pour l'imbibition précoce et de 40 heures pour l'imbibition tardive, ils sont indiqués par des flèches sur les courbes de germination (figure 28).

Les graines ont été reçues récemment, les différents dosages de radicaux n'ont pas encore été faits.

3.6 Discussion

Les différentes graines étudiées (sauf *H.vulgare* et le génotype B de *H.annuus*) montrent une perte de vigueur et de viabilité lorsqu'elles sont soumises à des traitements de détérioration contrôlée (figures 20, 23 et 26). Seules les graines d'*H.vulgare* y semblent insensibles (figure 28). Le traitement choisi (40°C et 75 % HR) est donc efficace sur 3 espèces de semences et inadapté pour *H.vulgare*. Il est possible qu'une prolongation du CDT au-delà de 14 jours soit nécessaire pour induire un effet sur la germination.

La production de O_2^- dans les semences d'*H.annuus* est identique que la plante mère ait subi ou non le stress hydrique (figure 21). Des mesures d'activité antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase et glutathion réductase) et de malondialdéhyde réalisées par l'UPMC ne montrent pas de différences pouvant expliquer une possible détoxification enzymatique des ROS produits lors du stress. Des mesures de molécules antioxydantes (glutathion, ascorbate, tocophérol et flavonoïdes) sont en cours chez différents partenaires. Dans les semences d'*A.thaliana*, le vieillissement des semences induit une diminution de 2 à 3 fois la production de O_2^- quelques soient les conditions de culture de la plante mère (figure 24). Le stress

thermique chaud n'induit pas d'effet anormal tandis que le stress thermique froid induit une diminution de la production de O_2^- de 50 % chez les graines fraîches et vieilles. Des mesures antioxydantes sont en cours chez les différents partenaires.

La spectroscopie RPE à haut champ semblait un outil prometteur permettant d'attester de l'identité chimique des radicaux et de la teneur en radicaux des semences. Les mesures effectuées ont permis d'identifier : la mélanine, radical présent dans le péricarpe du tournesol (figure 22), l'épi-catéchine, radical probablement présent dans les enveloppes d'*Arabidopsis* (figure 25 A) et du manganèse dans toutes les graines et en très grande quantité dans les enveloppes du chou (figure 27). Ces signaux sont toujours de forte amplitude et masquent ceux des autres radicaux. La présence d'épi-catéchine d'*A.thaliana* diminue lors de l'imbibition (figure 25 B). Le O_2^- produit par les axes embryonnaires de tournesol diminue également lors de l'imbibition (figure 21). Quelles que soient les semences mesurées, il n'y a pas de corrélation claire entre l'amplitude du signal et les traitements de vieillissement. De plus, les radicaux identifiés sont toujours de nature différente et jamais localisés dans les embryons. Par conséquent, la RPE à haut champ ne peut être utilisée comme méthode universelle pour évaluer la qualité des semences.

**4. Rôle des quinones réductases dans la
germination et le développement précoce
d'*A.thaliana***

Tableau IV : Germination à 25°C en lumière continue des mutants QR d'écotype Columbia disponibles au laboratoire dans des conditions de stress oxydant. MD signifie ménadione, MV méthylviologène. Les couleurs représentent les fluctuations par rapport au sauvage (WT) : le bleu souligne des phénotypes sauvages, le vert une germination accrue au WT, le rouge une germination plus faible. Les moyennes \pm l'erreur standard sont exprimées à partir de 3 répétitions de 50 graines.

Génotype	Germination (%)			
	eau	20 μ M MD	1 μ M MV	5 mM H ₂ O ₂
<i>WT</i>	52.8 \pm 2.0	74.0 \pm 3.7	50.5 \pm 3.7	45.2 \pm 1.6
<i>fqr1</i>	61.2 \pm 6.5	79.9 \pm 1.8	74.4 \pm 9.2	63.3 \pm 5.5
<i>fqr2</i>	64.1 \pm 3.8	82.9 \pm 2.3	58.4 \pm 4.4	47.8 \pm 1.4
<i>fqr4</i>	49.3 \pm 9.6	56.1 \pm 1.4	51.6 \pm 3.1	41.1 \pm 0.8
<i>fqr1fqr2</i>	48.0 \pm 7.3	78.8 \pm 5.0	65.3 \pm 7.2	38.5 \pm 11.5
<i>fqr1fqr4</i>	61.5 \pm 0.2	76.0 \pm 3.4	64.0 \pm 2.5	37.0 \pm 0.8
<i>nqr</i>	63.0 \pm 8.2	91.5 \pm 0.75	73.2 \pm 1.3	64.5 \pm 2.6
<i>nqrfqr1</i>	48.0 \pm 3.6	72.5 \pm 2.0	46.8 \pm 3.2	33.6 \pm 0.8

4.1 Introduction

L'objectif de cette partie est de caractériser des mutants KO de différentes QR : *nqr*, *fqr1* et le double mutant *nqrfqr1* à différentes étapes du développement. Le développement des mutants est ciblé car les ROS y jouent un rôle important. La germination est particulièrement étudiée étant donné que des phénotypes de germination de deux NADPH oxydases (isoformes B et D) ont été observés (Muller *et al.*, 2009 ; Leymarie *et al.*, 2012) et que les QR produisent du O_2^- comme le font les NADPH oxydases.

4.2 Description des mutants

4.2.1 Sélection des mutants

Les mutants KO *nqr* et *fqr* d'écotype Columbia envoyés par le centre européen de stockage des semences (NASC) sont hétérozygotes la plupart du temps (individus de la génération F1). *Arabidopsis thaliana* étant une plante qui s'autoféconde, il y a 1/4 des semences produites (F2) qui seront homozygotes pour la mutation selon la première loi de Mendel. Afin de déterminer de quels individus il s'agit, une feuille est prélevée à 3 semaines de développement sur une douzaine de plantes. L'ADN est extrait et des réactions de polymérisation en chaînes (PCR) sont effectuées pour sélectionner les mutants homozygotes pour un gène donné grâce à des amorces qui lui sont spécifiques. Une fois les individus homozygotes pour les mutations d'intérêts sélectionnées, les plantes poursuivent leur cycle jusqu'à l'obtention de graines homozygotes. Par la suite, des croisements des lignées stables homozygote *nqr* ou *fqr* ont été faits et les différents mutants sont présentés dans le tableau IV. Ce travail a été effectué par Eiri Heyno et les lignées *nqr* et *fqr1* sont publiées (Heyno *et al.*, 2013).

Des tests de germination préliminaires ont permis de distinguer les mutants (tableau IV). Différentes solutions sont utilisées pour imbiber les semences : l'eau, deux générateurs de ROS, la ménadione (MD) qui est également le substrat des QRs, le méthylviologène (MV) et le H_2O_2 qui est un ROS. Ces solutions permettent de préciser le rôle des ROS dans la germination et sont couramment utilisées. Leur concentration a été choisie selon les données

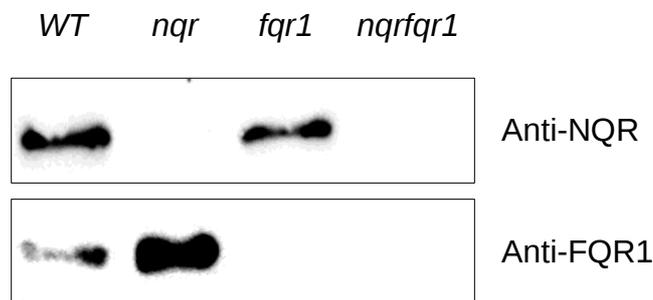


Figure 29 : Western blot de protéines totales extraites de feuilles de plantes sauvage et mutantes *nqr*, *fqr1* et *nqrfqr1* de 5 semaines.

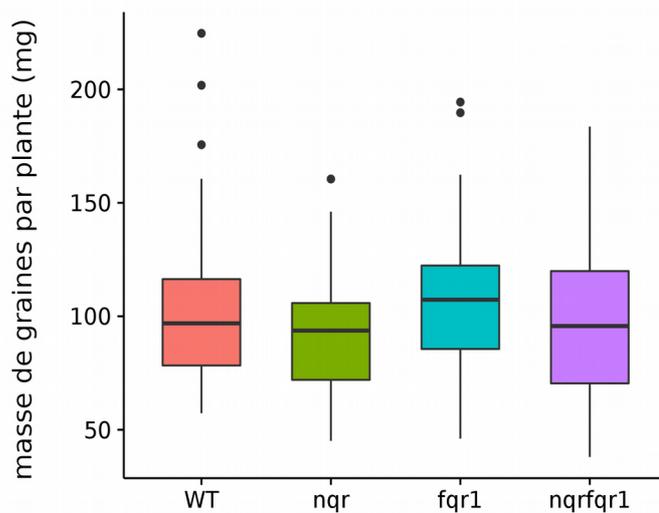


Figure 30 : Masse de graines sèches récoltées sur les plantes mères d'*A.thaliana* d'écotype Columbia. Les boîtes à moustaches représentent la distribution des masses pour chaque génotype. Le trait en gras dans la boîte représente la médiane des valeurs des 3 répétitions biologiques. La limite inférieure de la boîte délimite le premier quartile (c'est-à-dire la médiane des valeurs inférieures à la médiane de la population), la limite supérieure le troisième quartile (c'est-à-dire la médiane des valeurs supérieures à la médiane de la population). Les traits de part et d'autre de la boîte vont jusqu'aux valeurs minimale et maximale de la distribution en excluant les valeurs extrêmes, représentées par des points noirs.

publiées (5 mM H₂O₂, Lariguet *et al.*, 2013 ; 1 µM méthylviologène, Leymarie *et al.*, 2011) ou à partir de gammes de concentration (20 µM ménadione par Eiri Heyno). L'observation des résultats du sauvage montrent que seul le MD a un effet positif sur la germination. Aucun mutant ne présente de phénotype identique au sauvage pour tous les tests présentés. La moitié des mutants est faiblement affectée par les différents traitements en comparaison au sauvage, il s'agit de *fqr2*, *fqr4*, *fqr1fqr2* et *nqrfqr1*. La seconde moitié des mutants est davantage affectée (*fqr1*, *fqr1fqr4*, *nqr*). Ces trois mutants montrent une germination accrue par rapport au sauvage en présence d'eau et de MV. Le H₂O₂ a un effet positif sur les mutants *fqr1* et *nqr* mais un effet négatif sur *fqr1fqr4*. Le mutant *nqr* est le plus affecté, quelque soit la solution utilisée, sa germination est toujours accrue par rapport au sauvage. Le mutant *fqr1* montre des sensibilités semblables.

Étant donné le nombre important de mutants, il a été nécessaire d'en sélectionner afin de poursuivre l'étude. Les mutants *nqr* et *fqr1* sont particulièrement affectés ainsi ils ont été retenus de même que le double mutant *nqrfqr1*.

4.2.2 Vérification des mutants

Pour vérifier que les lignées sont propres, des western blots ont été faits et les résultats sont présentés en figure 29. Chez le mutant *nqr*, la protéine FQR1 est détectée mais pas la protéine NQR tandis que chez le mutant *fqr1*, la protéine NQR est détectée mais pas la protéine FQR1. Chez le double mutant *nqrfqr1* ni NQR ni FQR1 ne sont détectées. Les différents mutants ne produisent pas les QR dont ils sont sensés être délévés.

4.2.3 Masse des graines

4.2.3.1 Production de graines par les plantes mères

L'observation des plantes mutantes *nqr*, *fqr1* et *nqrfqr1* lors de la culture a permis de déterminer qu'elles semblent avoir un phénotype de croissance sauvage. Afin de savoir si ces plantes sont affectées au niveau de leur rendement de production de graines, les graines

Tableau V : Masses moyennes des graines produites par plante et masses de 1000 graines sèches. Les données représentent la moyenne \pm l'erreur standard (ES) de 16 plantes et de 1000 graines respectivement pour chacune des 3 répétitions biologiques. * indique les différences significatives entre le WT et les mutants ($P < 0.05$).

Génotype	Production moyenne de graines par plante (mg) \pm ES	Masse de 1000 graines (mg) \pm ES
WT	102.7 \pm 5.1	18.6 \pm 0.3
<i>nqr</i>	92.5 \pm 3.9	20.2 \pm 0.1 *
<i>fqr1</i>	108.2 \pm 4.9	18.1 \pm 0.2
<i>nqrfqr1</i>	98.4 \pm 5.5	18.5 \pm 0.6

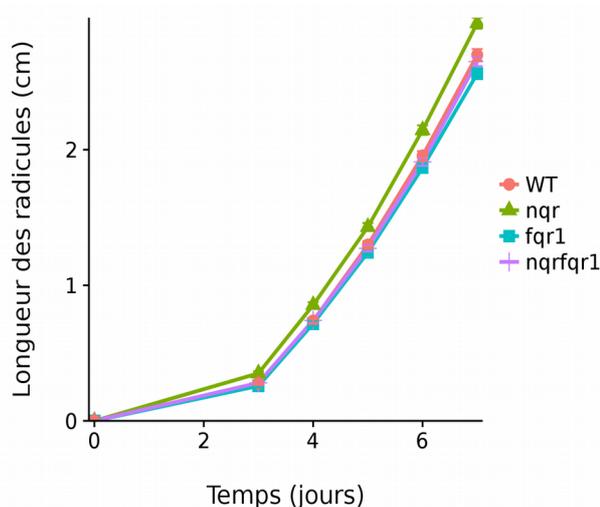


Figure 31 : Croissance de la racine pendant 7 jours en conditions de jours longs (16 heures de lumière d'intensité $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à 22°C et 8 heures d'obscurité à 18°C). Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard de 3 réplicats biologiques et de 2 réplicats techniques de 15 plantules.

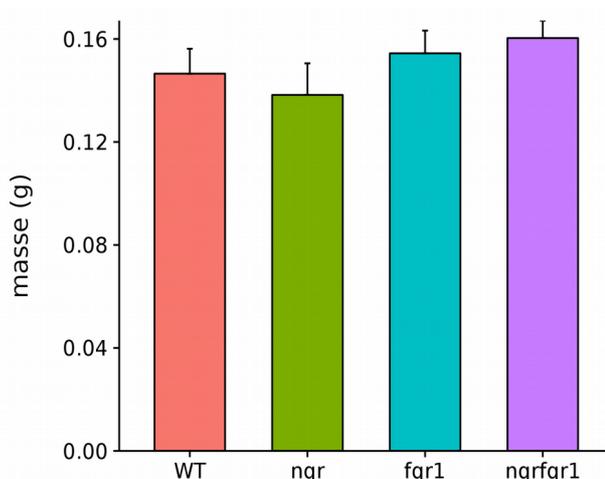


Figure 32 : Masses de la rosette de plantes de 3 semaines cultivées en jours longs. Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard de 3 réplicats biologiques de 10 à 15 plantes.

matures de chaque plante sont récoltées séparément puis pesées. Les résultats sont présentés figure 30. La masse de graines produites par plante montre une distribution semblable pour tous les génotypes. Les masses moyennes sont aussi très proches aux environs de 100 mg (tableau V) et ne montrent pas de différence significative. L'observation des graines sèches sous loupe binoculaire n'a pas permis de déterminer des différences de taille des graines.

4.2.3.2 Poids de 1000 graines sèches

Mesurer le poids de 1000 graines permet de comparer à nombre égal, la masse des semences. Seul le mutant *nqr* montre une différence significative de presque 10 % par rapport au sauvage (tableau V).

Une étude sur des graines de pois (Rybinski *et al.*, 2006) montre que la mutation d'un gène peut affecter cette mesure ainsi que le poids des graines récoltées sur les plantes. Or il est bien visible que ces deux mesures sur les mutants *nqr* sont différentes, il est difficile de conclure. Il est possible que les plantes *nqr* produisent moins de graines que le sauvage mais qu'elles soient plus lourdes. Des comptages du nombre de graines produits par chaque plante permettraient de répondre à cette hypothèse.

4.2.4 Croissance des racicules de plantules

Les mesures de croissance des racicules permettent de quantifier des défauts de développement précoce des parties racinaires. La figure 31 montre le suivi de la croissance de la racicule pendant 7 jours. Les mutants QR montrent un phénotype sauvage.

4.2.5 Croissance des plantes

4.2.5.1 Masse de plantes de 3 semaines

Afin d'approfondir les données concernant les plantes QR, la culture a été poursuivie jusqu'à 3 semaines puis les rosettes ont été pesées (figure 32). De fortes disparités de masse

Tableau VI : Mesures à l'IMAGING-PAM de 3 paramètres photosynthétiques (qN, qP, Fv/Fm) sur des plantes de 18 jours stressées. Le stress chaud correspond à 1 heure à 37°C, le stress froid à une culture de 4 jours à 5°C en lumière continue. Les moyennes \pm l'erreur standard sont exprimées à partir de mesures prises sur 4 à 6 plantes. Les * et ** indiquent les différences significatives entre le WT et les mutants, respectivement $P < 0.05$ et $P < 0.1$.

stress	contrôle				froid				chaud			
	WT	nqr	fqr1	nqrfqr1	WT	nqr	fqr1	nqrfqr1	WT	nqr	fqr1	nqrfqr1
qN	0.722 ± 0.009	0.747 ± 0.014	0.696 ± 0.013	0.688 ± 0.021	0.726 ± 0.011	0.775 ± 0.011	0.780 ± 0.015	0.794 ± 0.017	0.838 ± 0.007	0.817 ± 0.017	0.823 ± 0.013	0.837 ± 0.009
qP	0.439 ± 0.017	0.364 * ± 0.007	0.347 * ± 0.020	0.286 * ± 0.008	0.576 ± 0.009	0.493 * ± 0.025	0.528 ** ± 0.019	0.528 ** ± 0.018	0.450 ± 0.020	0.440 ± 0.015	0.445 ± 0.031	0.384 * ± 0.012
Fv/Fm	0.739 ± 0.005	0.685 * ± 0.006	0.711 * ± 0.008	0.684 * ± 0.008	0.706 ± 0.009	0.699 ± 0.008	0.662 * ± 0.013	0.665 * ± 0.013	0.596 ± 0.006	0.616 ± 0.009	0.601 ± 0.013	0.594 ± 0.008

sont relevées au sein des plantes de chaque génotype si l'on observe les barres d'erreur, cela est typique au niveau d'une population. Les masses des mutants sont identiques au sauvage.

4.2.5.2 Effet des QR sur la photosynthèse

Afin de déterminer si les mutations impactent l'efficacité de la photosynthèse, des mesures à l'imaging-PAM de paramètres tels que qP , qN et F_v / F_m sont effectuées sur des plantes de 3 semaines. qP détermine la proportion de centres réactionnels de photosystème II (PSII) ouverts. F_v / F_m permet de déterminer le rendement quantique maximum du PSII. qN est le quenching de fluorescence non-photochimique.

Le tableau VI regroupe tous les résultats obtenus. Le paramètre qN n'est pas affecté par les mutations ou les stress en comparaison aux plantes sauvages. Les paramètres qP et F_v / F_m ont des valeurs inférieures chez les plantes mutantes cultivées dans des conditions contrôles. Suite au stress froid, le paramètre qP de tous les mutants reste affecté mais moins que dans les conditions contrôle tandis que seules les valeurs de F_v / F_m des mutants *fqr1* et *nqrfqr1* sont différentes du sauvage. Lors du stress chaud, seul le double mutant est affecté au niveau de qP , les mutants simples montrent des valeurs semblables au sauvage.

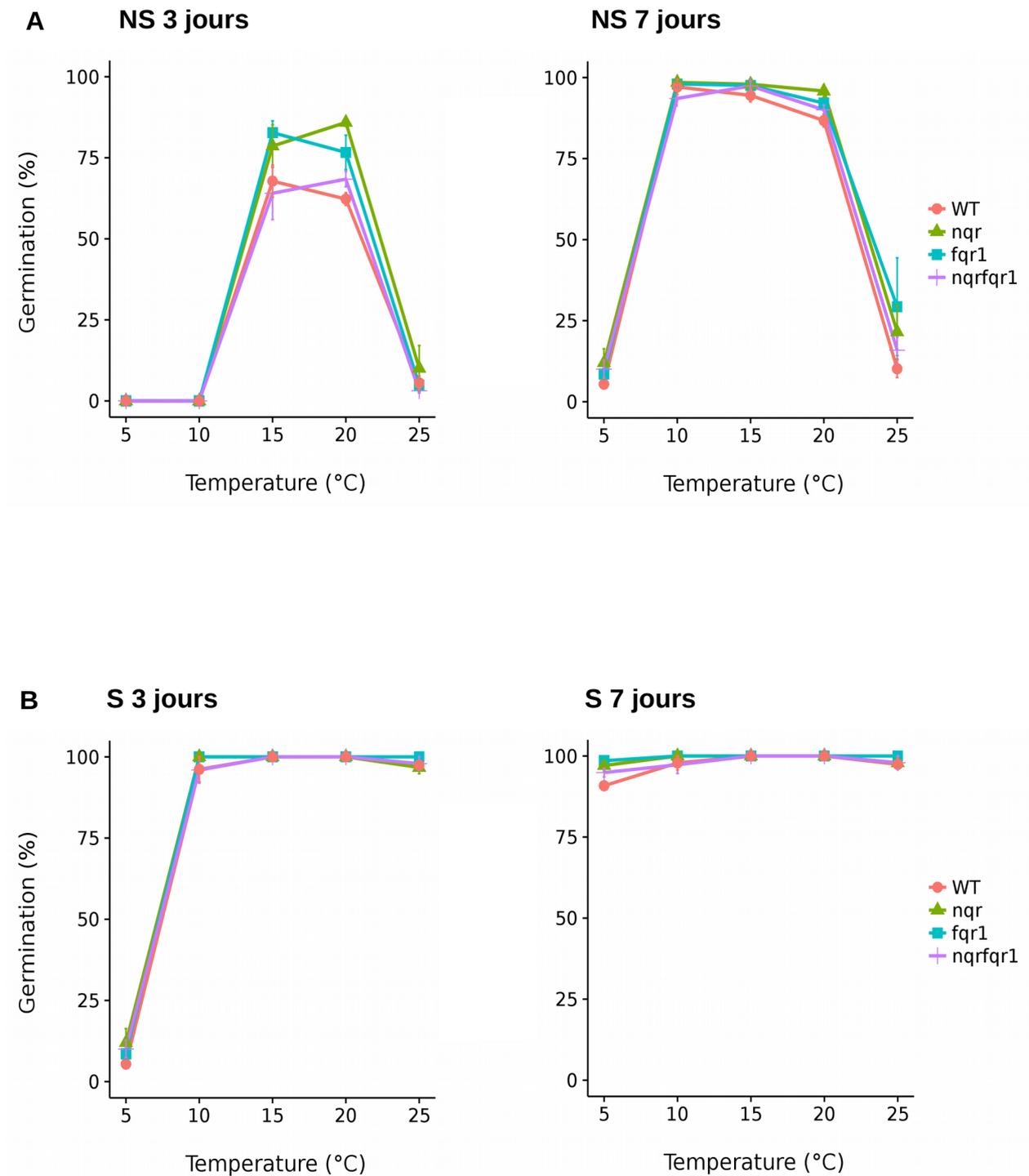


Figure 33 : Germination de semences (A) non stratifiées (NS) et (B) stratifiées (S) à l'obscurité en fonction de la température à 3 et 7 jours. Les semences sont préalablement stratifiées 4 jours à l'obscurité. Les résultats représentent la moyenne \pm erreur standard de 3 répétitions de 80 à 100 graines.

4.3 Physiologie de la germination des semences d'*A.thaliana*

Des facteurs environnementaux tels que la température, la lumière, la teneur en oxygène et la durée de stockage des semences influencent la levée de dormance et la germination. Ces quatre facteurs seront étudiés dans cette partie sur les mutants QR.

4.3.1 Effet de la température

La figure 33 montre l'effet de la température sur la dormance et la germination des semences à l'obscurité. La stratification par le froid est un procédé permettant de lever la dormance des graines imbibées. Toutes températures confondues, les semences non stratifiées (NS) germent plus lentement que les semences stratifiées (S). A 7 jours les semences stratifiées (figure 33 B) de chaque génotype ont totalement germées quelque soit la température, ainsi, la stratification a permis de lever la dormance.

Il est dans ce cas plus intéressant de s'intéresser aux semences non stratifiées pour voir des résultats plus contrastés (figure 33 A). Au bout de 3 jours à 15°C, la germination des mutants *nqr* et *fqr1* est plus rapide que le sauvage (67.8%) et atteint respectivement 78.6 % et 82.7 %. La tendance est légèrement plus marquée à 20°C. Au bout de 7 jours, la germination à 15°C et 20°C est optimale pour tous les génotypes. Aux températures basses, la germination est ralentie mais elle atteint 100% au bout de 7 jours à 10°C et 18 jours à 5°C. Tous les génotypes montrent une dormance à 25°C.

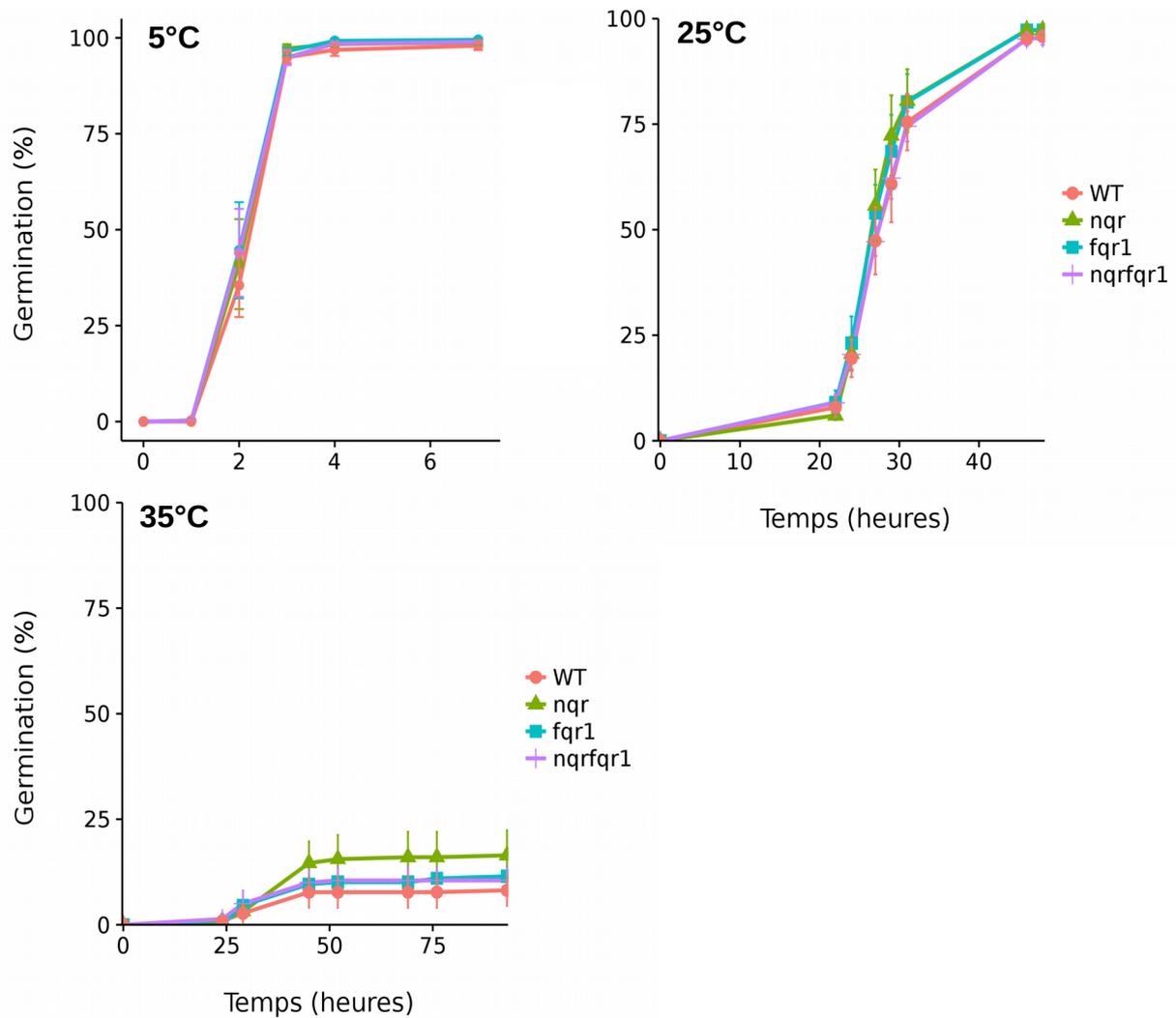


Figure 34 : Germination à différentes températures et à la lumière de semences stratifiées. Les résultats représentent la moyenne \pm erreur standard de 3 réplicats biologiques de 50 semences.

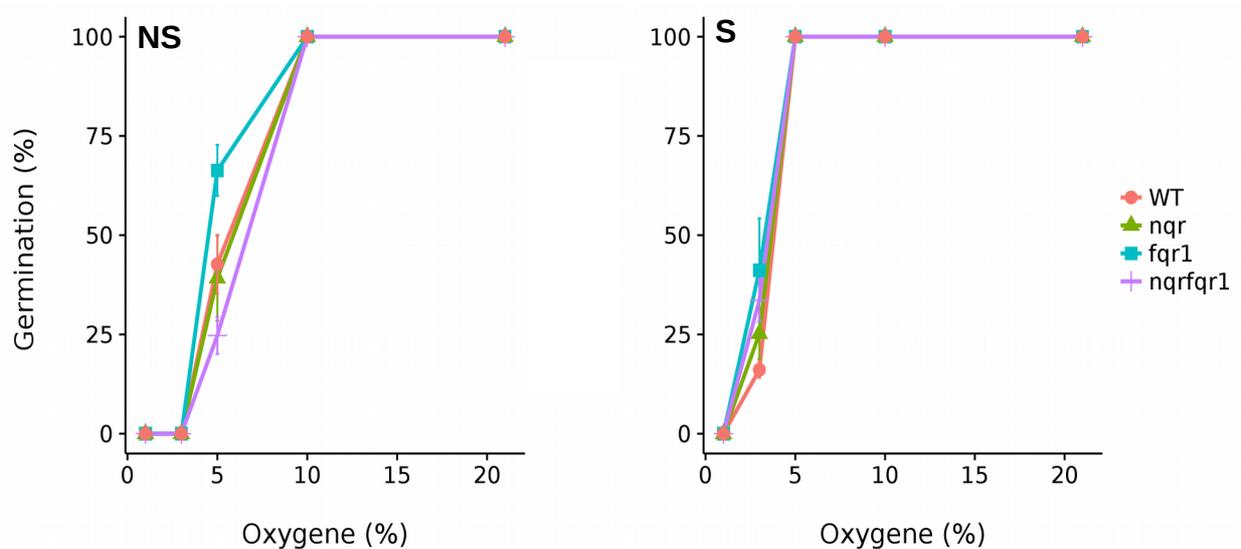


Figure 35 : Effet de l'hypoxie sur la germination de semences non stratifiées (NS) et stratifiées (S) après 6 jours d'imbibition à 23°C en lumière continue. Les résultats représentent la moyenne \pm l'erreur type de 3 réplicats de 80 à 100 semences.

4.3.2 Effet de la lumière

Chez *A.thaliana*, la germination est induite par la lumière essentiellement *via* les phytochromes (Sullivan and Deng, 2003). Lors de l'étude de mutants il est intéressant de soumettre les graines à des tests de germination tels que ceux présentés en figure 34. Ici encore, les mutants ne montrent pas de phénotype à la lumière que ce soit à 5°C ou à 25°C. A 35°C, toutes les semences sont thermodormantes, ni la stratification ni la lumière ne permettent de lever la dormance.

4.3.3 Effet de l'oxygène

Dans la nature, les graines peuvent être soumises à des conditions d'hypoxie lorsqu'elles sont submergées. Les semences lorsqu'elles sont imbibées, reprennent les activités métaboliques. Pour cela, l'oxygène est essentiel à la respiration cellulaire et au développement des graines. L'application d'un stress hypoxique peut permettre de discriminer les mutants. Les résultats des tests des tests de germination sont présentés en figure 35.

Les graines testées selon qu'elles soient stratifiées ou non réagissent différemment au stress. Les semences non stratifiées sont plus sensibles à l'hypoxie puisque la germination est inhibée sous une atmosphère contenant moins de 5 % d'oxygène tandis que les semences stratifiées ont la capacité de germer totalement. Ces résultats suggèrent que les semences non stratifiées ont besoin de davantage d'oxygène pour germer.

Pour toutes les semences la germination est optimale à partir de 10 % d'oxygène. Des différences sont observées chez les graines mutantes non stratifiées en présence de 5 % d'oxygène. Le mutant *fqr1* est moins sensible à l'hypoxie, sa germination atteint 66.3 % contre 42.7 % pour le sauvage. Le mutant *nqr* ne montre pas de différence avec le sauvage tandis que *nqrfqr1* semble plus sensible au stress avec 24.7 % de germination. Les semences stratifiées montrent des résultats ayant les mêmes tendances à 2.5 % d'oxygène.

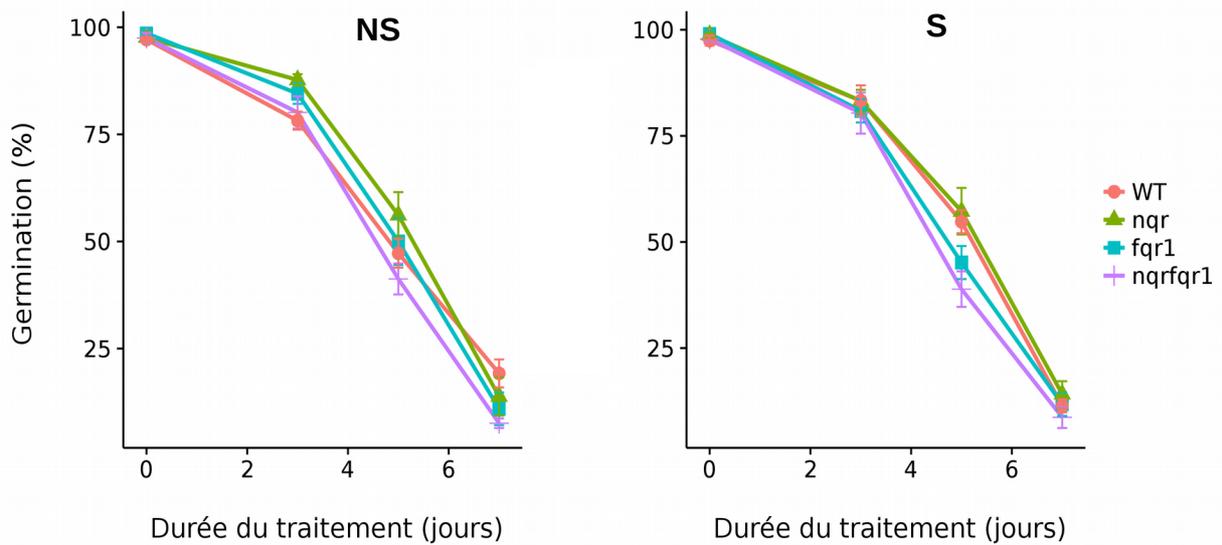


Figure 36 : Effet de traitement de détérioration contrôlée à 40°C et 75 % HR sur des semences non stratifiées (NS) et stratifiées (S) après 7 jours d'imbibition à 25°C. Les résultats représentent la moyenne \pm erreur standard de 3 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques de 50 semences.

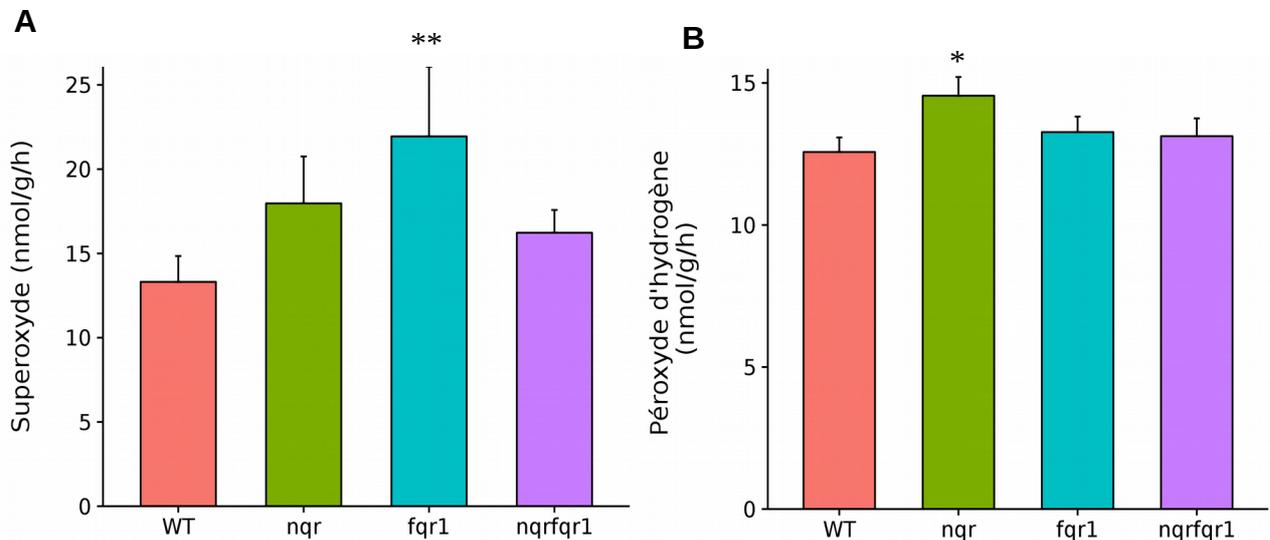


Figure 37 : dosage de (A) l'anion superoxyde et (B) peroxyde d'hydrogène sur des semences d'*A.thaliana* imbibées 24 heures. Les résultats sont représentés par les moyennes de 3 répétitions biologiques et 4 répétitions techniques de 20 mg de graines sèches \pm l'erreur standard. Les * et ** indiquent les différences significatives entre le WT et les mutants, respectivement $P < 0.05$ et $P < 0.1$.

4.3.4 Effet du traitement de détérioration contrôlé

Le CDT permet de reproduire l'effet du vieillissement sur des graines de façon contrôlée. La figure 36 montre l'effet du CDT sur des graines stratifiées ou non, les résultats sont semblables dans les deux cas. Les semences non traitées ont une germination optimale tandis que les semences sauvages traitées 3 jours, 5 jours ou 7 jours et non stratifiées ont une germination de 78.2 %, 47.3 % et 19.2 % respectivement. Les mutants QR ont un phénotype sauvage de germination en CDT.

4.4 Étude du métabolisme ROS lors du développement précoce des mutants QR

4.4.1 Production de ROS dans les semences imbibées

Les QR sont considérées comme étant des enzymes produisant du $O_2^{\cdot-}$ (Schopfer *et al.*, 2008). Le $O_2^{\cdot-}$ peut être dismuté en H_2O_2 spontanément ou sous l'effet de la SOD. Le H_2O_2 et le $O_2^{\cdot-}$ sont dosés et les résultats se trouvent figure 37. Il est intéressant de noter que la production de $O_2^{\cdot-}$ (figure 37 A) ne suit pas les mêmes tendances que la production de H_2O_2 (figure 37 B).

Les graines *nqr* et *nqrfqr1* produisent légèrement plus de $O_2^{\cdot-}$ que le sauvage. Les graines *fqr1* montrent une production significativement accrue de 40 % par rapport au sauvage. La production de H_2O_2 des graines *nqr* est environ 20 % plus importante que le sauvage et la différence est significative. Les autres mutants *fqr1* et *nqrfqr1* ne montrent pas de différences.

4.4.2 Activité des enzymes anti-oxydantes dans des plantules

Étant donné que les mutants QR ne sont pas affectés de la même façon dans la production de $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 , il est possible que cette différence se produise grâce à des activités différentes des enzymes antioxydantes détoxifiant ces ROS. La figure 38 rassemble

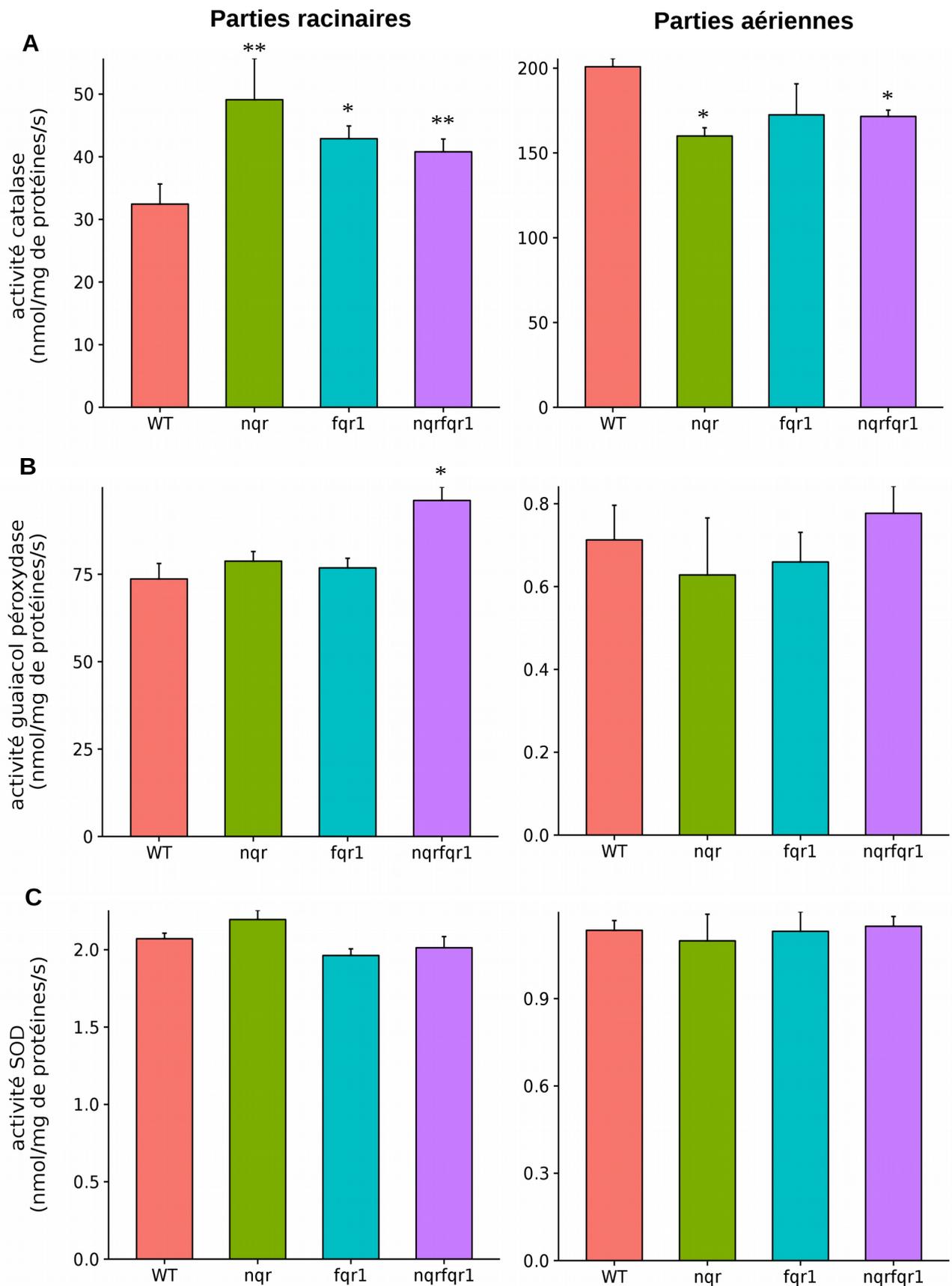


Figure 38 : Activités (A) catalase, (B) guaiacol peroxydase, (C) superoxyde dismutase (SOD) des parties racinaires et aériennes de plantules de 7 jours. Les résultats représentent la moyenne de 3 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques \pm erreur standard. Les * et ** indiquent les différences significatives entre le WT et les mutants, respectivement $P < 0.05$ et $P < 0.1$.

les résultats des dosages d'activité de 3 enzymes anti-oxydantes : la catalase, la guaiacol peroxydase et la SOD. Au niveau des parties racinaires, *nqr* présente une activité catalase (figure 38 A gauche) accrue de 50 % par rapport au sauvage, pour les mutants *fqr1* et *nqrfqr1* l'augmentation est moins importante : 33 % et 25 % respectivement. La guaiacol peroxydase (figure 38 B gauche) a une activité comparable au sauvage tandis que le mutant *nqrfqr1* montre une augmentation de 30 %. L'activité SOD n'est pas affectée par les mutations QR (figure 38 C gauche).

Au niveau des parties aériennes les résultats sont moins contrastés. L'activité catalase est réduite de 20 % chez *nqr* et de 15 % chez *nqrfqr1* (figure 38 A droite). Les activités guaiacol peroxydase et de la SOD ne sont pas affectées chez les mutants QR (figures 38 B et C droite).

En conclusion, les tendances d'activité catalase mesurées chez les mutants pour les parties aériennes et racinaires sont contraires. Il semblerait que la catalase ait une activité tissu-spécifique chez les mutants QR. Ces résultats d'activités d'enzymes impliquées dans la détoxification de ces ROS ne permettent pas d'expliquer les différences dans la production de O_2^- et de H_2O_2 .

4.5 Discussion

Les divers tests de germination réalisés sur les mutants QR (figures 33 et 34) ne permettent pas de retrouver le même phénotype que celui des mutants NADPH oxydases, à savoir une dormance plus importante et une inhibition de la germination par rapport au sauvage (Müller *et al.*, 2009, Leymarie *et al.*, 2011). Simultanément à mon étude, Juliette Puyaubert (équipe « Biologie des semences » de l'UPMC) a testé la germination de plusieurs mutants de la NADPH oxydase et n'a pas retrouvé les phénotypes attendus (résultats non publiés, discussions personnelles).

Les tests de germination après les traitements de détérioration contrôlée (figure 36) ne permettent pas de déterminer de tendance claire alors qu'il était attendu que les semences QR soient moins sensibles au traitement. Il est possible que les seuils de tolérance au stress de ces graines aient été atteints et que la production de ROS soit délétère.

Au niveau de la production de ROS, les 3 mutants produisent plus de O_2^- que le sauvage et *nqr* produit également plus de H_2O_2 (figure 37). Ce résultat va dans le sens d'un rôle anti-oxydant de FQR1 ce qui est en accord avec les conclusions de Heyno *et al.*, (2013). Cette étude a montré que le mutant *nqr* produit plus de ROS que *fqr1* et le WT et qu'après l'infection par *B.cinerea*, les deux mutants simples ont une production de ROS accrue. Une autre étude de Song *et al.*, (2016), dans laquelle une SmQR provenant d'une plante modérément tolérante au stress salin, *Salix matsudana* a été surexprimée chez *A.thaliana*. Suite à un stress salin de 200 mM, les feuilles d' *A.thaliana* surexprimant SmSR semblent produire moins de O_2^- et de H_2O_2 ce qui encore une fois encore corrobore les résultats présentés ici.

Enfin, le développement des plantes QR est normal, que ce soit au niveau de la production de graines, de la croissance des parties racinaires ou aériennes (figure 30, tableau V ; figure 31 ; figure 32 et tableau VI ; respectivement). Les dosages d'activité d'enzymes anti-oxydantes (figure 38) de plantules sont assez peu affectés. Dans l'étude de Song *et al.*, 2016, après un traitement de 200 mM NaCl de plantes d' *A.thaliana* de 2 semaines, les activités d'enzymes anti-oxydantes (SOD et peroxydase) ont été mesurées. Les résultats ont déterminé qu'il y a une augmentation de leur activité après le stress dans les lignées surexprimant SmQR. Ce résultat est différent de ceux que j'ai obtenus sur les plantules de 7 jours (pas de différences entre mutants et sauvage) mais il est aussi possible que les comportements des QR changent selon l'âge, les phases de développement d'*A.thaliana* et le stress subi. De plus, en regroupant les résultats obtenus pour les dosages de ROS et les activités d'enzymes anti-oxydantes, il semblerait que les QR aient un rôle ambivalent, tantôt pro-oxydant, tantôt anti-oxydant comme cela a été prouvé chez les animaux (review : Dinkova-Kostova et Tatalay, 2010).

L'ensemble des résultats sur la germination est déconcertant car non conforme à la théorie de fenêtre oxydative pour la levée de dormance et la germination (Bailly *et al.*, 2008). Cet effet des ROS a été principalement documenté chez les graines de tournesol (Oracz *et al.*, 2007, El-Maarouf-Bouteau *et al.*, 2008, Oracz *et al.*, 2009). Cependant, il est possible que cette théorie ne s'applique pas chez les autres espèces notamment chez *Arabidopsis thaliana*. Ensuite, il faut noter que dès l'imbibition des semences, leur métabolisme s'active. Dès lors le O_2^- est produit en partie par des enzymes mais aussi majoritairement par la chaîne de transfert

d'électrons mitochondriale. L'effet d'une enzyme dans l'ensemble de ce système peut avoir un effet mineur. Il est tout à fait probable que le défaut de QR ou de NADPH oxydases soit compensé par l'une ou l'autre lorsqu'elles sont présentes. Afin de déterminer l'importance de la production enzymatique de O_2^- dans la germination il serait nécessaire de construire des mutants combinées KO des NADPH oxydases (isoformes b et d potentiellement impliquées) et des QR. Si les plantes et les graines sont viables, il serait alors possible de distinguer la production de O_2^- mitochondriale et enzymatique et ainsi de répondre aux différentes questions l'impliquant dans le développement des plantes.

Les résultats de germination en conditions d'hypoxie montrent que les mutants n'ont pas tous les mêmes sensibilités. Cependant, il est difficile de savoir quelles QR ont un effet étant donné que les graines *fqr1* sont moins sensibles, *nqr* sont insensibles et *nqrfqr1* sont hypersensibles. Benech-Arnold *et al.*, 2006 ont montré que des conditions d'hypoxie dans des grains de blé induisaient une augmentation de la teneur en ABA dans les embryons. L'ABA étant une hormone induisant le maintien des semences dans un état de dormance, ces semences germent moins vite que des semences non soumises à l'hypoxie. Il semblerait que l'oxygène interfère avec le métabolisme de l'ABA dans les grains de blé. Des dosages de cette hormone sur les graines QR d'*A.thaliana* soumises à l'hypoxie permettrait de déterminer si le processus est le même que chez le blé.

De nombreuses études suggèrent que les voies de signalisations hormonales et les ROS interagissent dans les semences (ABA : Baek *et al.*, 2015 ; éthylène et ABA chez le tournesol : El-Maarouf-Bouteau *et al.*, 2014 ; GA et ABA : Liu Y *et al.*, 2010). L'étude de Chen *et al.*, (2014) montre que des mutants perte de fonction *apx6* (ascorbate peroxydase 6, APX est une enzyme utilisant l'ascorbate comme substrat pour réduire le H_2O_2 en eau) ont une germination réduite ainsi qu'une sensibilité accrue à l'ABA et l'auxine. Des résultats similaires sont retrouvés à d'autres phases du développement des plantes concernant la NADPH oxydase (review : Xia *et al.*, 2015). Un exemple très étudié est la signalisation ABA dans les cellules de garde de stomates. Kwak *et al.*, (2003) ont montré que des doubles mutants perte de fonction de *rbohD/F* (deux gènes codant des isoformes de la NADPH oxydase) sont affectés au niveau de la voie de signalisation de l'ABA des cellules de garde permettant la fermeture des stomates, les canaux calciques ne sont pas activés et le Ca^{2+} qui est un messager secondaire essentiel n'est plus accumulé. De l' H_2O_2 exogène permet de

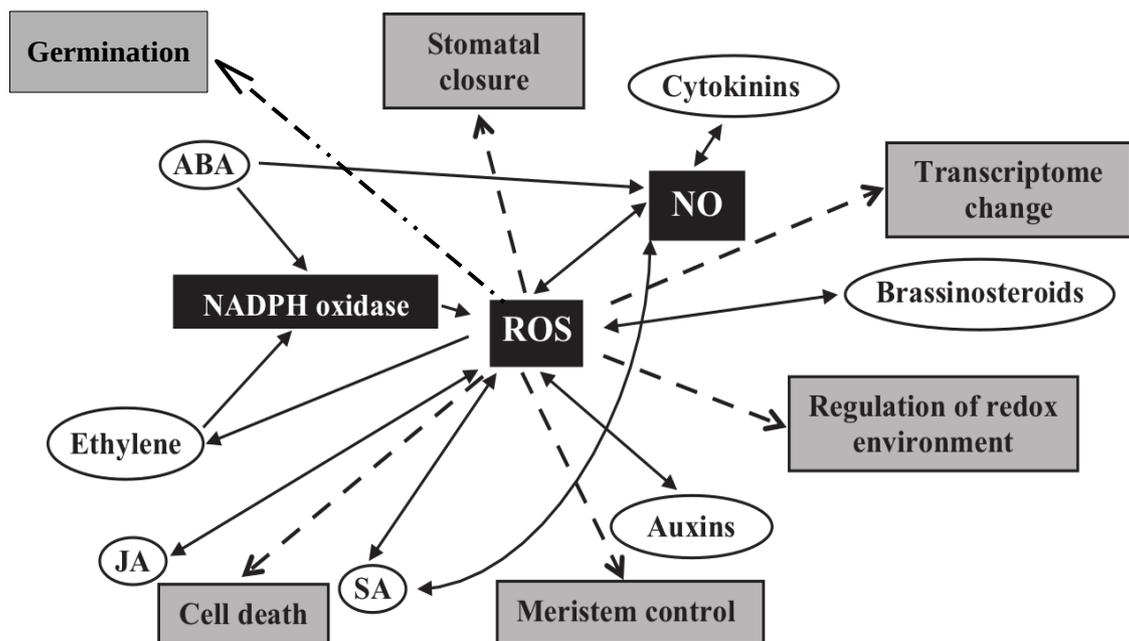


Figure 39 : Interaction des ROS et des voies de signalisation hormonales (modifié à partir de Kocsy *et al.*, 2013). Les cases grises indiquent les processus influençant le développement des plantes. Les cases noires montrent les principaux médiateurs des effets des hormones et de l'environnement rédox des cellules. Les ovales blancs entourent les hormones (ABA : acide abscissique, SA : acide salicylique et JA : acide jasmonique). Les ROS, le NO (oxyde nitrique) et la NADPH oxydase jouent un rôle central dans la médiation des différentes voies de signalisation hormonales indispensables au développement des plantes.

sauver le phénotype et en rétablissant le signal Ca^{2+} . Ainsi, la NADPH oxydase ferait partie de la voie de signalisation ABA dans les cellules de garde et les ROS seraient des messagers secondaires.

Les différents travaux cités montrent que les ROS sont impliquées dans les voies de signalisation d'une multitude de processus qui sont souvent imbriqués (figure 39) (Considine et Foyer, 2014). C'est pourquoi il serait nécessaire de poursuivre ce travail en croisant les voies de signalisation ROS et hormonales. Il peut être intéressant de doser différentes hormones dans les graines et les plantes délétées de toutes QR (quintuple mutant *nqrfqr1fqr2fqr3fqr4*). Au niveau de la germination, des tests simples en présence d'ABA, de GA et d'éthylène permettraient de nous éclairer sur l'interaction des QR avec celles-ci.

**5. Rôle de AIR12 et NQR dans la
germination et le développement précoce
d'*A.thaliana***

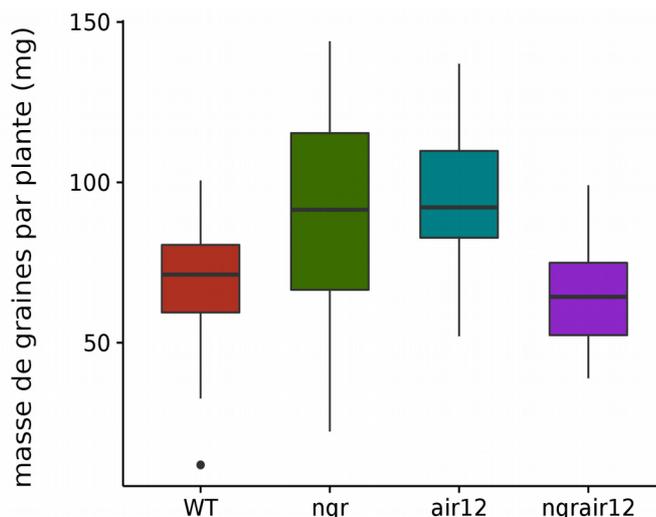


Figure 40 : Masse de graines sèches récoltées sur les plantes mères d'*A.thaliana* d'écotype Ler. Les boîtes à moustaches représentent la distribution des masses de graines produites pour les 16 plantes des 3 répétitions biologiques. Le trait en gras dans la boîte représente la médiane des valeurs des 3 répétitions biologiques. La limite inférieure de la boîte délimite le premier quartile (c'est-à-dire la médiane des valeurs inférieures à la médiane de la population), la limite supérieure le troisième quartile (c'est-à-dire la médiane des valeurs supérieures à la médiane de la population). Les traits de part et d'autre de la boîte vont jusqu'aux valeurs minimale et maximale de la distribution en excluant les valeurs extrêmes, représentées par des points noirs.

Tableau VII : Masse moyenne des graines produites par plante et masse de 1000 graines sèches. Les données représentent la moyenne \pm l'erreur standard (ES) de 16 plantes et de 1000 graines respectivement pour chacune des 3 répétitions biologiques. Les * et ** indiquent les différences significatives entre le WT et les mutants ($P < 0.05$ et $P < 0.1$ respectivement).

Génotype	Production moyenne de graines par plante (mg) \pm ES	Masse de 1000 graines sèches (mg) \pm ES
WT	87.6 \pm 5.2	15.6 \pm 0.5
nqr	98.1 \pm 5.1 *	15.8 \pm 0.6
air12	101.2 \pm 4.6 *	15.1 \pm 0.3
nqrair12	64.0 \pm 2.8 **	15.1 \pm 0.3

5.1 Introduction

L'objectif de cette partie est de déterminer le rôle physiologique de NQR et AIR12 à l'aide de l'étude de mutants KO *nqr*, *air12* et *nqrair12*. NQR et AIR12 sont des candidats proposés pour un transfert d'électrons à travers la membrane plasmique. Deux études suggèrent qu'ils auraient un rôle dans l'état rédox de l'apoplaste suite à l'infection par des champignons (Heyno *et al.*, 2013 et Costa *et al.*, 2015). Ce travail vise à déterminer ce qu'il en est dans des conditions de stress abiotiques comme des températures basses. Pour ce faire, le développement des plantes est observé à différents stades (germination, plantules jusqu'à 7 jours et plantes adultes de 3 à 4 semaines). Des dosages de ROS ainsi que d'activités d'enzymes anti-oxydantes permettent de déterminer l'accumulation de ROS.

5.2 Description des mutants

5.2.1 Sélection des mutants

Les lignées *nqr* et *air12* d'écotype Landsberg ont été commandées chez NASC et l'obtention de lignées stables a été effectuée par Eiri Heyno de la même façon que pour les mutants *nqrfqr* d'écotype Columbia. Les croisements pour obtenir le double mutant *nqrair12* ont été effectués à partir des lignées homozygotes stables *nqr* et *air12*. J'ai participé au génotypage de la génération F2. Pour cela une PCR a été réalisée dans le but de sélectionner les plantes F2 homozygotes pour les mutations des gènes NQR et AIR12.

5.2.2 Masse des graines produites par les plantes mères

Afin de savoir si ces plantes sont affectées au niveau de leur rendement de production de graines, les graines matures et sèches de chaque plante sont récoltées séparément puis pesées. Les résultats sont présentés en figure 40 et tableau VII. Tout d'abord la distribution des masses dans les cultures est différente, les plantes *nqr* et *air12* ont des masses de graines plus importantes que le sauvage avec des valeurs médianes 25 % plus hautes (figure 40)

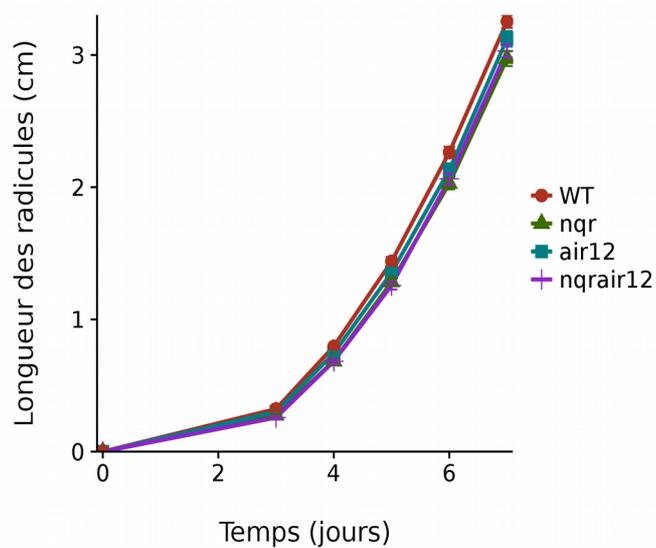


Figure 41 : Croissance de la racine pendant 7 jours (moyenne \pm erreur standard). Les moyennes sont faites à partir de 3 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques de 15 plantules pour chaque génotype.

Tableau VIII : Masse moyenne des rosettes récoltées sur des plantes d'*A.thaliana* contrôle âgées de 3 semaines et stressées de 4 semaines (15°C lumière continue). La moyenne \pm l'erreur standard est exprimée pour 3 répétitions biologiques de 10 à 15 plantes. Les * indiquent les différences significatives entre le WT et les mutants à $P < 0.05$.

Génotype	Masse moyenne des rosettes (mg) \pm ES	
	Contrôle	Stressé
WT	90.0 \pm 3.9	137.8 \pm 11.6
nqr	107.8 \pm 5.8 *	134.3 \pm 6.8
air12	106.0 \pm 5.4 *	156.9 \pm 13.1
nqrair12	102.5 \pm 4.6 *	134.5 \pm 9.6

tandis que le double mutant n'est pas affecté. Les masses moyennes de graines produites par plante (tableau VII) montrent également des différences significatives avec environ 30 % de mg de graines supplémentaires pour *nqr* et *air12*. Ce qui surprend est que le double mutant *nqrair12* a une masse de graines produites légèrement plus faible que le sauvage. L'observation des graines sèches à la loupe binoculaire ne permet pas de distinguer de différences dans la taille des graines (données non montrées).

5.2.3 Poids de 1000 graines

Mesurer le poids de 1000 graines permet de comparer à nombre égal, la masse des semences produites. Les mesures montrent qu'il n'y a pas de différence entre les mutants et le sauvage (tableau VII). En regroupant les informations obtenus dans la partie précédente et celle-ci, il semble que les plantes *nqr* et *air12* produisent plus de graines que le sauvage et le double mutant *nqrair12* sans que leur taille et leur poids par graine ne diffèrent.

5.2.4 Croissance des racines de plantules

Les mesures de croissance des racines permettent de quantifier des défauts de développement précoce des parties racinaires. La figure 41 montre le suivi de la croissance de la racine pendant 7 jours. Tous les mutants montrent un phénotype sauvage. De plus, des différences au niveau du nombre et de la longueur des racines latérales n'ont pas été observées.

5.2.5 Croissance des plantes

A l'observation des plantes mutantes lors de leur croissance, il était difficile de déterminer précisément les différences au niveau du développement. Peser les rosettes des plantes permet de quantifier les différences de croissance. Le tableau VIII présente la masse des rosettes de plantes contrôle de 3 semaines (culture à 23°C à la lumière pendant 16 heures

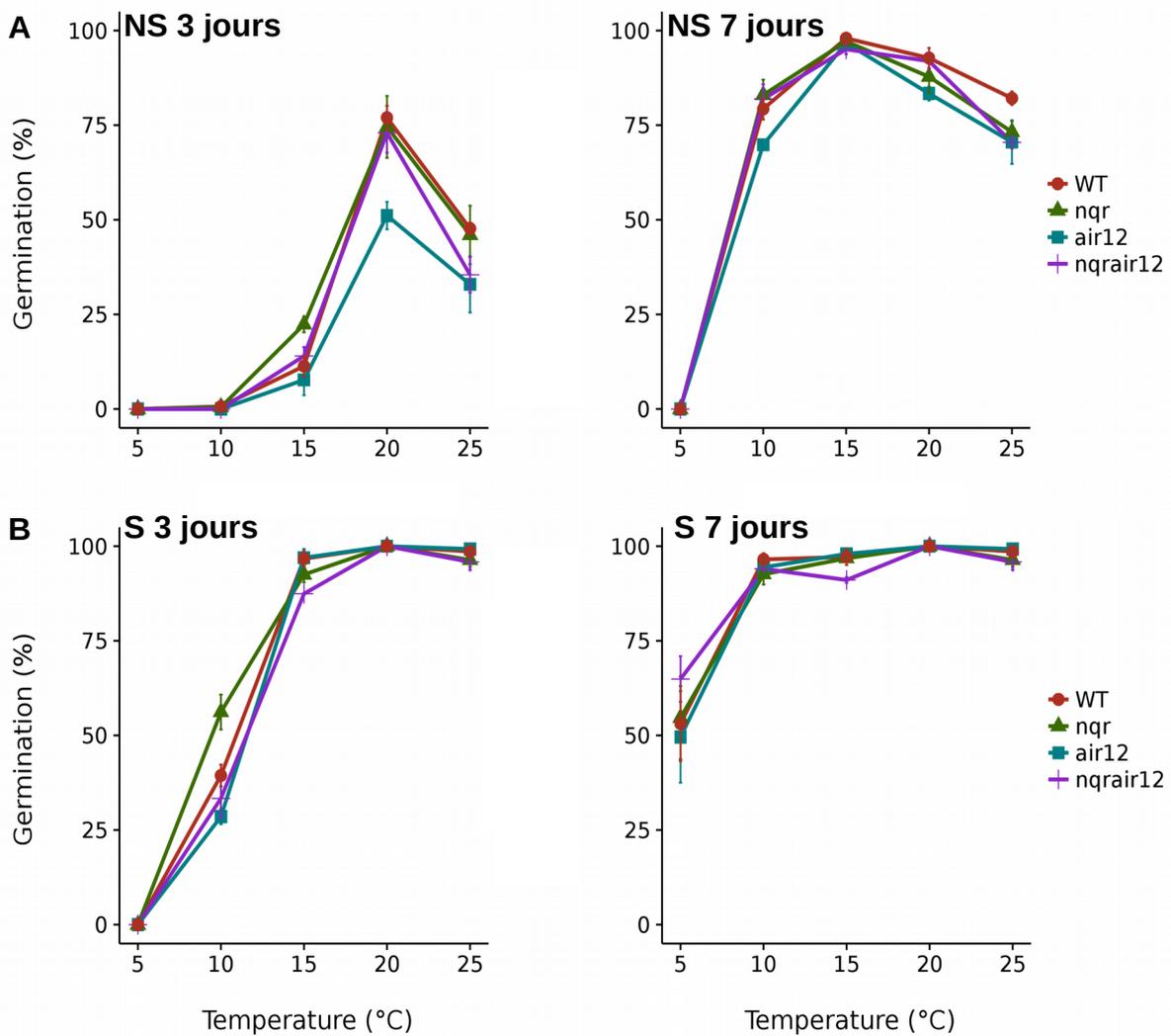


Figure 42 : Germination de semences (A) non stratifiées (NS) et (B) stratifiées (S) à l'obscurité en fonction de la température à 3 et 7 jours. La moyenne \pm l'erreur standard est exprimée à partir de 3 répétitions biologiques de 80 à 100 graines.

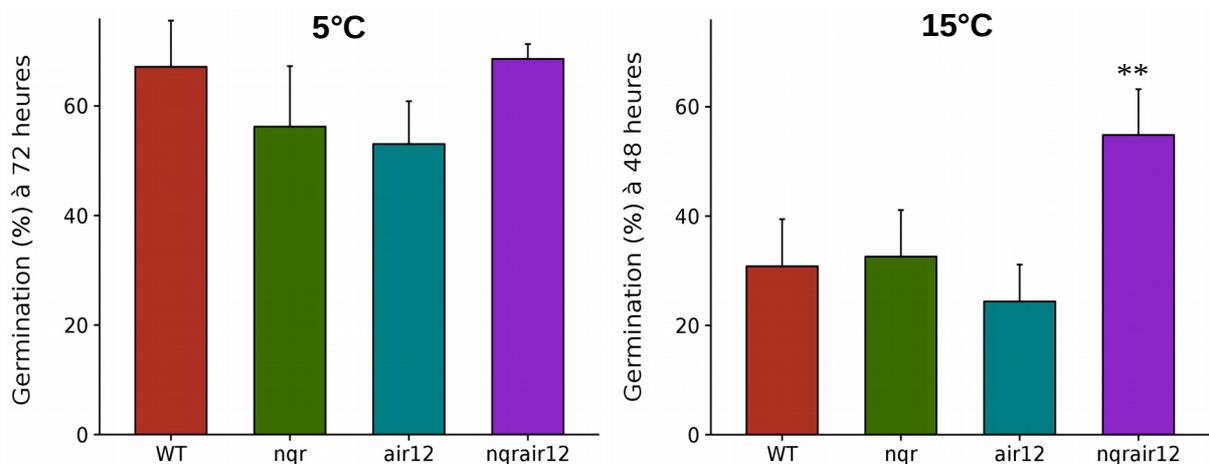


Figure 43 : Germination à différentes températures et à la lumière de semences stratifiées. La moyenne \pm l'erreur standard est exprimée à partir de 3 répétitions biologiques de 80 à 100 graines. ** indique les différences significatives entre le WT et les mutants, respectivement à $P < 0.1$.

et 18°C à l'obscurité) et de plantes stressées de 4 semaines (culture à 15°C en lumière continue). L'application d'un stress peut permettre de discriminer des mutants.

Chez les plantes contrôle, 10 à 20 % de différence de masse sont observés chez tous les mutants en comparaison au sauvage. La croissance accrue des plantes mutantes permet d'expliquer leur production de graines plus importante que le sauvage. De façon surprenante, ces différences ne sont pas retrouvées chez les plantes stressées. Elles ont un phénotype sauvage dans ces conditions.

5.3 Physiologie de la germination des semences d'*A.thaliana*

Des facteurs environnementaux tels que la température, la lumière, la teneur en oxygène et la durée de stockage des semences influencent la levée de dormance et la germination. Ces quatre facteurs seront étudiés dans cette partie sur les mutants QR.

5.3.1 Effet de la température

La figure 42 montre l'effet de la température sur la dormance et la germination des semences à l'obscurité. Toutes températures confondues, les semences non stratifiées (NS) germent plus lentement que les semences stratifiées (S). La température optimale de germination des graines stratifiées semble être 20°C (figure 42 B). Plus la température est basse plus la germination est lente. A 10°C au bout de 3 jours, le mutant *nqr* germe plus rapidement, à 56.2 % contre 39.4 % pour le sauvage. A 7 jours les semences stratifiées de chaque génotype ont totalement germées entre 10°C et 25°C, ainsi, la stratification a permis de lever la dormance. A 5°C les semences montrent une germination totale au bout de 14 jours sans montrer de différences entre les génotypes.

Il est dans ce cas plus intéressant de s'intéresser aux semences non stratifiées pour voir des résultats plus contrastés (figure 42 A). Au bout de 3 jours à 5°C et 10°C la germination est nulle, à 15°C elle ne dépasse pas les 25 %. A 20°C, seules les graines *air12* montrent une réduction de la germination de 30 % par rapport au sauvage. Après 7 jours, la température

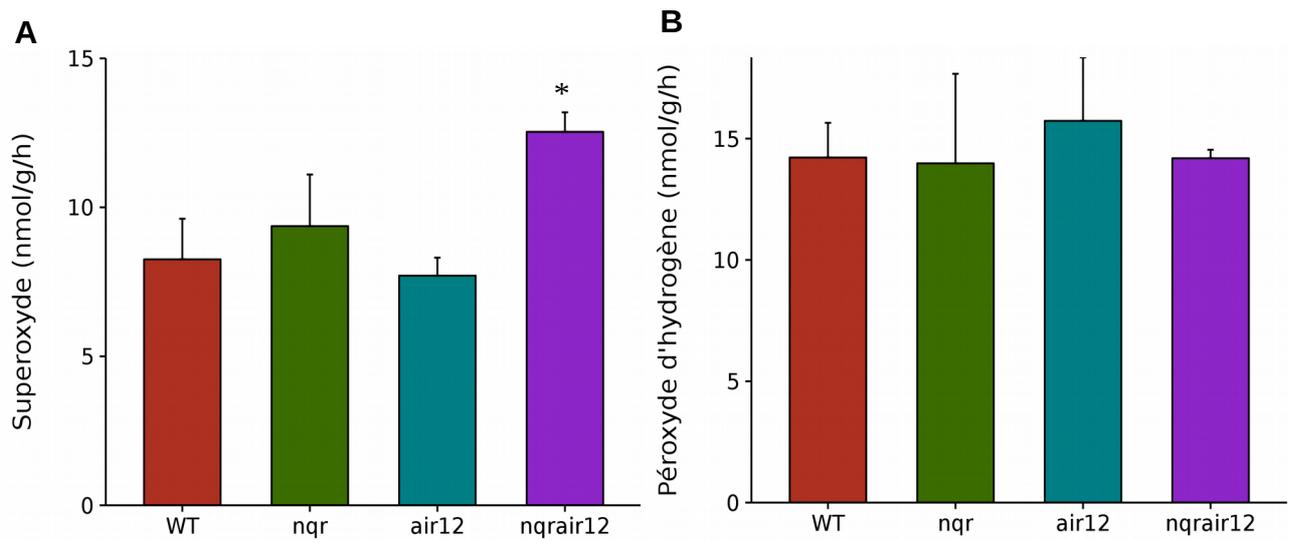


Figure 44 : Dosage de (A) l'anion superoxyde et (B) peroxyde d'hydrogène sur des semences imbibées 48 heures. Les résultats sont représentés par les moyennes \pm l'erreur standard de 6 répétitions (3 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques de 20 mg de graines sèches), * indique les différences significatives entre le WT et les mutants, respectivement $P < 0.05$.

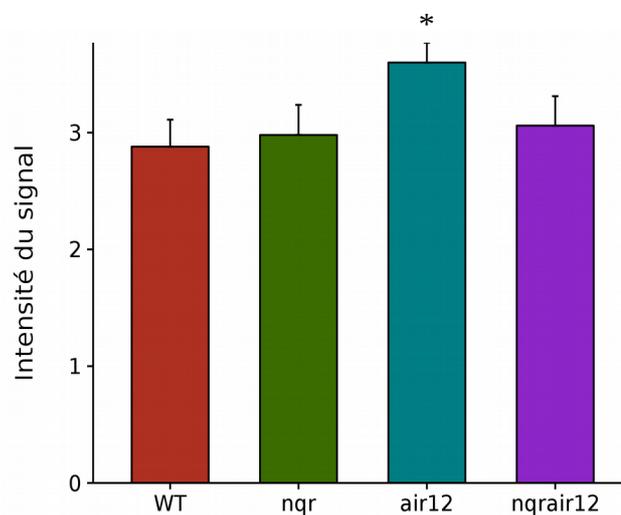


Figure 45 : dosage du radical hydroxyl par RPE spin-trap dans des plantules de 5 jours. La moyenne \pm l'erreur standard est exprimée à partir de 3 répétitions biologiques de 18 plantules, * indique les différences significatives entre le WT et les mutants, respectivement $P < 0.05$.

optimale de germination est de 15°C. Les graines sont toujours dormantes à 5°C, il faut attendre 18 jours pour que la germination soit totale. La germination est quasi-totale à 10°C, 20°C et 25°C, et atteint 100 % au bout de 10 jours. Les mutants se comportent de la même façon que le sauvage.

5.3.2 Effet de la lumière

Chez *A.thaliana*, la germination est induite par la lumière essentiellement *via* les phytochromes (Sullivan et Deng, 2003). Lors de l'étude de mutants il est intéressant de soumettre les graines à des tests de germination tels que ceux présentés en figure 43. Les tests de germination à 5°C montrent que la germination est plus rapide qu'à l'obscurité au bout de 3 jours. Aucune différence entre le sauvage et les mutants n'est observée. A 15°C, le double mutant *nqrair12* a une germination 2 fois plus importante que le sauvage. Le double mutant semble être sensible à la lumière. Étonnement, les mutants simples ont un phénotype de germination sauvage. L'absence simultanée de NQR et AIR12 engendre une stimulation de la germination dans ces conditions. Il semble que ces deux protéines aient un rôle inhibiteur synergique dans la germination.

5.4 Étude du métabolisme ROS lors du développement précoce des mutants QR

5.4.1 Production de ROS dans les semences imbibées

NQR est considérée comme étant une enzyme produisant du $O_2^{\cdot-}$ (Schopfer *et al.*, 2008) et AIR12 est un cytochrome réductible par $O_2^{\cdot-}$. Le $O_2^{\cdot-}$ peut être dismuté en H_2O_2 et O_2 spontanément ou sous l'effet de la superoxyde dismutase. Le dosage de ces deux ROS dans les graines paraît donc important afin de déterminer si l'absence de NQR et de AIR12 engendre des changements de leur production.

La comparaison des figures 44 A et 44 B montre des profils de production de $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 différents pour le mutant *nqrair12* tandis que les autres mutants ont des productions similaires au sauvage. En effet, la production de $O_2^{\cdot-}$ du double mutant est 50 % plus

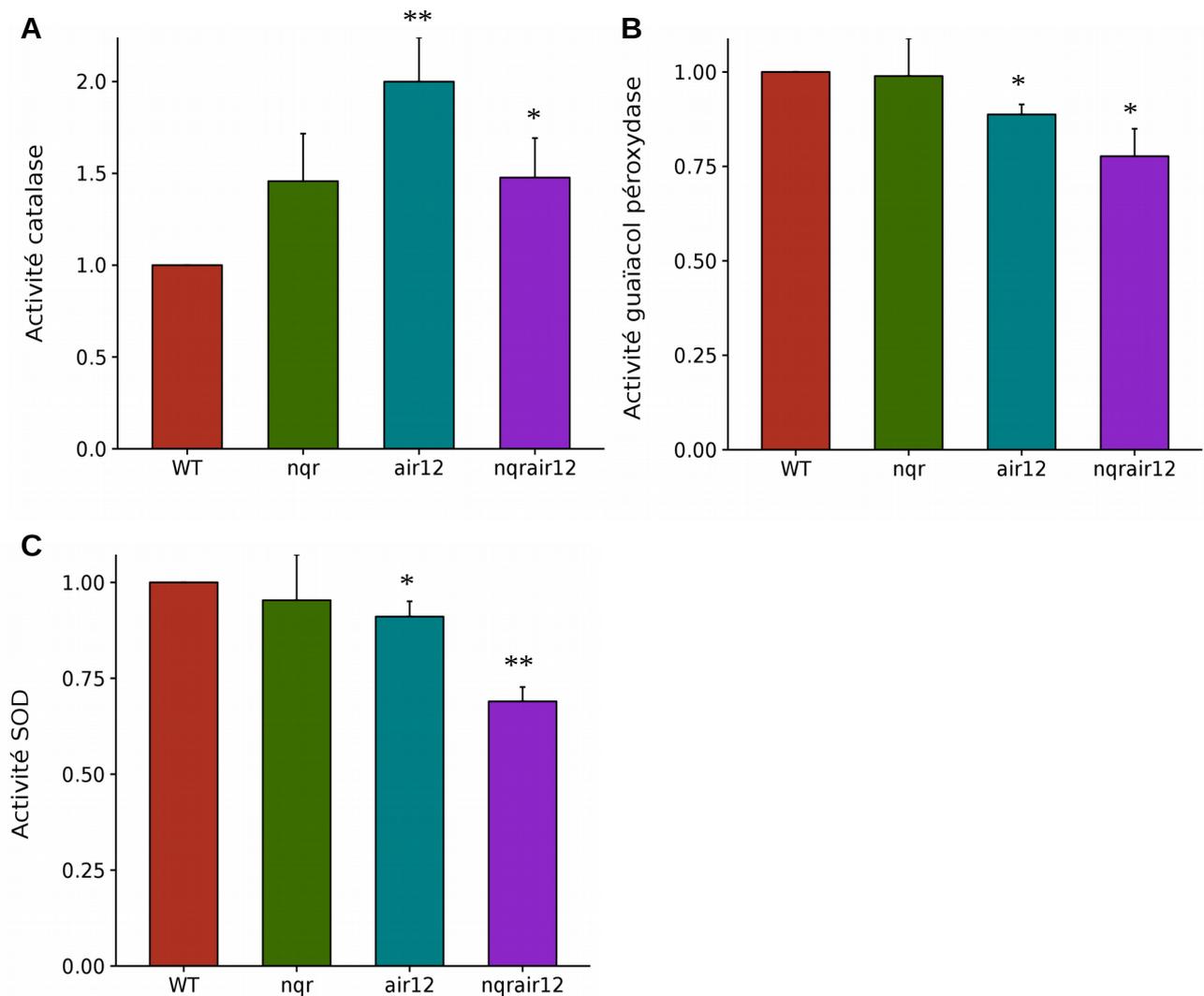


Figure 46 : Activités (A) catalase, (B) guaiacol peroxydase, (C) superoxyde dismutase (SOD) de plantules entières de 5 jours. Les activités des mutants sont normalisées en prenant le sauvage pour référence, les activités du sauvage sont égales à 1. Les activités du sauvage utilisées pour la normalisation sont : pour la catalase 20.5 nmol O₂/s/mg de protéines; pour la guaiacol peroxydase 12.1 nmol tétraguaiacol/s/mg de protéines et pour la SOD 1.05 nmol/s/mg de protéines. Les moyennes ± l'erreur standard sont exprimées à partir de 3 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques de 60 à 90 plantules. Les * et ** indiquent les différences significatives entre le WT et les mutants (P < 0.05 et P < 0.1 respectivement).

importante que celle du sauvage, de *nqr* et *air12*. Il est intéressant de constater que la figure 44 A a un profil similaire à la figure 43 B portant sur les tests de germination à 15°C à la lumière. Les dosages de H₂O₂ (figure 44 B) permettent de conclure sur le fait qu'il n'y a pas de différence de production chez les mutants dans ces conditions.

5.4.2 Production du radical hydroxyl dans des plantules

Le HO· est un produit au niveau des parois cellulaires par les peroxydases. L'hypothèse de ce chapitre est que NQR et AIR12 interagissent au niveau de la membrane pour créer un transfert d'électrons. Ce transfert peut aussi influencer sur la production de ROS au niveau de l'apoplaste et de la paroi. Ainsi, des expériences de spin trap (ou piégeage de spin) par résonance paramagnétique électronique ont été réalisées sur des plantules de 5 jours (figure 45). Les mutants *nqr* et *nqrair12* produisent autant de HO· que le sauvage tandis que le mutant *air12* en produit 25 % de plus.

5.4.3 Activité des enzymes anti-oxydantes dans des plantules

Étant donné que les mutants *nqr*, *air12* et *nqrair12* ne sont pas affectés de la même façon dans la production de O₂⁻ et de H₂O₂, il est possible que des enzymes antioxydantes détoxifient ces ROS. La figure 46 rassemble les résultats des dosages d'activité de 3 enzymes anti-oxydantes : la catalase, la guaiacol peroxydase et la SOD. Le mutant *nqr* montre uniquement une augmentation de l'activité catalase de 45% par rapport au sauvage. Pour les mutants *air12* et *nqrair12*, l'activité catalase est significativement accrue de 100 % et 50 %, l'activité guaiacol peroxydase diminue de 10 % et 20 % et l'activité SOD diminue de 10 % et 30 %.

5.5 Discussion

L'observation de la croissance de plantules jusqu'à 7 jours n'a pas permis de distinguer de phénotype chez les mutants notamment au niveau racinaire (figure 41). Ce résultat est différent de ce qui a été observé par Gibson et Todd (2015). A 13 jours de croissance dans des conditions similaires, les mutants *air12* montrent un développement des racines primaire et latérales affecté. En présence d' H_2O_2 et d'auxine, cet effet est accentué au niveau de la racine primaire. Ces différences peuvent être dues à l'âge des plantules (7 jours dans mon étude vs 13 jours pour Gibson et Todd). Il est possible que le phénotype racinaire ne soit pas observable lors du développement précoce des plantules.

L'observation de la croissance des plantes a montré que les mutants *nqr* et *air12* semblent avoir une rosette plus développée (tableau VIII) et qu'ils produisent plus de graines que le sauvage dans des conditions contrôle (figure 40 et tableau VII). Le double mutant partage certaines de ces caractéristiques notamment au niveau de la rosette, mais il semble également produire moins de graines par plante. Toutes les mutations ont donc un effet sur le développement des plantes adultes d'au moins 3 semaines dans des conditions contrôle. Après avoir cultivé les plantes 4 semaines à 15°C en lumière continue, les différences au niveau des masses de rosettes observées en conditions contrôle ne sont pas retrouvées (tableau VIII). Le stress semble avoir un effet négatif sur leur croissance. Ces résultats suggèrent que NQR et AIR12 ont un rôle dans le développement des plantes.

Les tests de germination à l'obscurité (figure 42 B) donnent des résultats différents de ceux réalisés à la lumière à 15°C (figure 43 B). En effet, le double mutant *nqrair12* germe deux fois plus vite que le sauvage et les mutants simples à la lumière. Gibson et Todd (2015), ont montré que le mutant *air12* a une germination accrue de 60 % par rapport au sauvage dans des conditions de culture de jours longs (16 heures de lumière à 23°C et 8 heures d'obscurité à 18°C). Il est possible que les différences observées entre mes résultats et cette étude soient dues à des différences de conditions de culture.

Le dosage de O_2^- montre également une augmentation de la production de 50 % chez *nqrair12* (figure 44 A). Les relevés de germination à 15°C (figure 43) ainsi que le dosage de O_2^- montrent des profils identiques. La germination de *nqrair12* est corrélée à une production accrue de O_2^- . D'après la théorie de la fenêtre oxydative, il est possible que ce soit la

production de O_2^- qui induise la germination chez les doubles mutants. Les dosages de H_2O_2 montrent que tous les mutants ont une production comparable au sauvage (figure 44 B). Les dosages du radical HO^\cdot montrent une production accrue chez les plantules *air12* (figure 45). Mes résultats sont bien différents de ceux exprimés par Gibson et Todd (2015) et Costa *et al.*, (2015). Chez Gibson et Todd, de l'imagerie en présence de marqueurs de ROS fluorescents a permis de montrer que les mutants *air12* de 8 jours ont une accumulation réduite de ROS au niveau des racines latérales. Ces résultats sont qualitatifs et non quantitatifs, des dosages de ROS auraient permis une meilleure comparaison avec mes résultats. Chez Costa *et al.*, des dosages de H_2O_2 , de O_2^- et de HO^\cdot ont été faits sur des plantes de 4 à 5 semaines. Les mutants *air12* ont une production de ROS identique au sauvage tandis que les mutants surexprimant AIR12 produisent plus de H_2O_2 , et de O_2^- que le sauvage. Le matériel utilisé n'a pas le même âge. A différentes phases du développement, il est possible que les protéines AIR12 n'aient pas le même rôle ni la même activité.

Les mesures d'activité d'enzymes anti-oxydantes révèlent une augmentation de l'activité catalase chez tous les mutants (résultats identiques pour le mutant *air12* dans Gibson et Todd, 2015), et une diminution des activités peroxydase et SOD chez les mutants *air12* et *nqrair12*. En synthétisant les données portant sur les ROS, il semblerait que l'absence d'AIR12 inhibe les voies de détoxification médiées par la SOD et la guaiacol peroxydase mais aussi induise l'activité catalase et l'accumulation du HO^\cdot . Ces résultats tendent vers l'idée que AIR12 induirait la détoxification de ROS dans les plantules. Dans les semences, NQR et AIR12 pourraient agir de concert en induisant une diminution de la production de O_2^- et donc un retard de la germination suite à des stress tels que des températures basses (15°C ici).

Pour confirmer l'ensemble de mes résultats, il serait nécessaire de construire des lignées de réinsertion afin de vérifier si la présence des deux protéines rétablit le phénotype sauvage mais aussi de tester des mutants surexprimant NQR et AIR12.

L'ensemble des études réalisées sur AIR12 portent sur l'effet de stress abiotique (Gibson et Todd 2015) et biotique (Costa *et al.*, 2015). Dans ces deux études, il semblerait que AIR12 ait plutôt un rôle pro-oxydant. Cela indiquerait que AIR12 pourrait avoir un rôle dans la production de ROS au niveau apoplastique et pariétal et éventuellement dans le relâchement de la paroi. Étant donné que mes expériences, qui ont été réalisées en majorité en l'absence de stress, indiquent plutôt un rôle anti-oxydant de AIR12, il serait nécessaire de

poursuivre l'étude en incluant d'autres types de stress. Une étude approfondie sur la production de ROS chez les mutants *nqr*, *air12* et *nqrair12* en présence d'auxine permettrait de déterminer leur rôle dans les voies de signalisation associées.

6. Caractérisation des protéines recombinantes NQR et AIR12

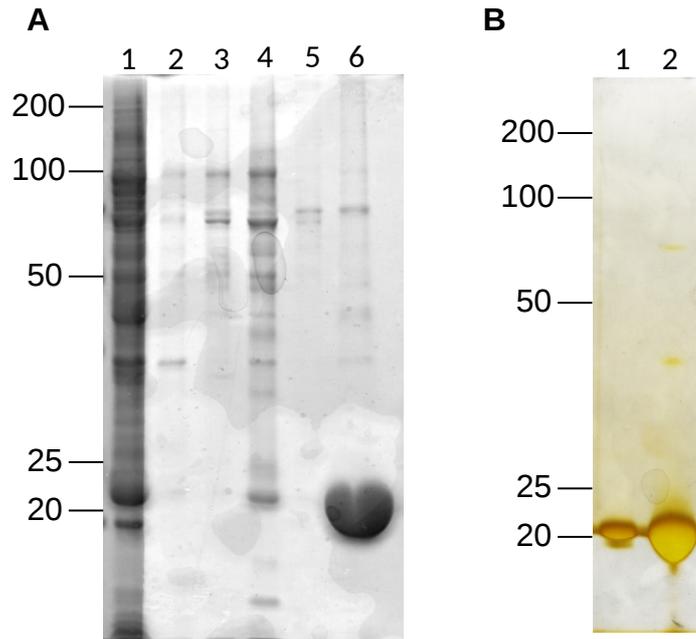


Figure 47 : Gel SDS-PAGE (A) coloré au bleu de Coomassie, (B) coloré au nitrate d'argent, des échantillons récoltés aux différentes étapes de purification de NQR. Les chiffres sur la gauche indiquent le poids moléculaire (kDa). (A) Les puits contiennent : 1, des protéines solubles totales, 2, les protéines récoltées après l'élution de la colonne de Ni avec du tampon, 3, les protéines récoltées après l'élution avec 15 mM d'imidazole, 4, et 5 : respectivement début et fin d'élution avec 60 mM d'imidazole et 6 : élution avec 300 mM d'imidazole. (B) Les puits contiennent : 1, 1 µg de NQR purifié et 2, 10 µg de NQR purifiée.

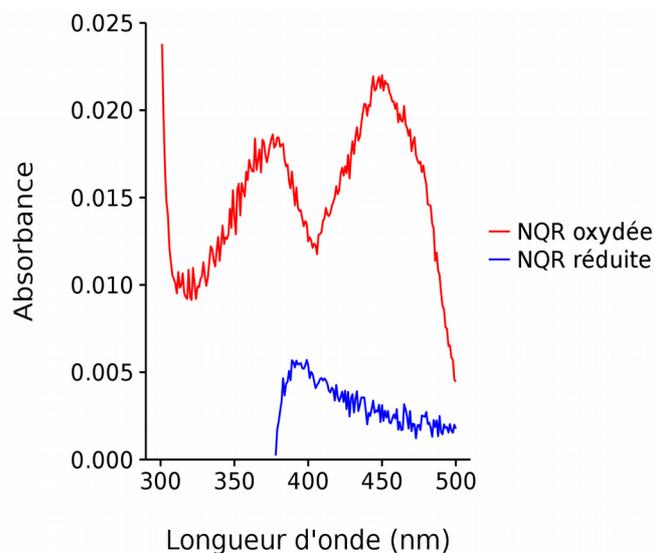


Figure 48 : Spectre UV-visible de AtNQR oxydé et réduit grâce à du dithionite à pH 7.5.

6.1 Caractérisation de la protéine recombinante AtNQR

6.1.1 Production d'une flavoprotéine active

6.1.1.1 Production hétérologue

Le plasmide pET28-AtNQR a été construit par l'équipe de Paolo Trost de l'Université de Bologne, Italie (Sparla *et al.*, 1999). J'ai transformé la bactérie *E.coli* puis optimisé le protocole de culture pour obtenir un rendement important. L'enzyme recombinante est couplée à une étiquette Histidine, de ce fait elle a été purifiée sur une colonne de Nickel. Un gel SDS-PAGE a été réalisé à chaque étape de la purification (figure 47). La coloration au bleu de Coomassie (figure 47 A) révèle que l'échantillon protéique récolté après l'élution à 300 mM d'imidazole contient principalement une protéine d'une vingtaine de kiloDaltons, identifiée comme étant NQR par western blot (résultat non montré). La coloration au nitrate d'argent (figure 47 B) permet de déterminer que l'échantillon de NQR purifié contient peu de protéines non identifiées et que leur concentration semble être minoritaire par rapport à la concentration de NQR. Grâce à des dosages de protéines par la méthode de Bradford et à des mesures d'absorbance à 280 nm, le rendement a pu être estimé à 45 mg de AtNQR par litre de culture.

6.1.1.2 Spectres de l'enzyme oxydée et réduite

La figure 48 montre les spectres UV-visibles de AtNQR. Le spectre de NQR oxydée possède deux maximums d'absorption à 375 nm et 450 nm. Ce profil est typique d'une protéine à cofacteur flavine (Bottin et Lagoutte, 1992). Après la réduction au dithionite, les deux maximums disparaissent montrant une réduction de la flavine. Sparla *et al.*, 1996, ont identifiés par HPLC la flavine de NQR extrait à partir de feuilles de tabac comme étant du FMN.

Tableau IX : Comparaison de l'activité de NQR en présence de différentes quinones (BQ signifie benzoquinone, NQ naphthoquinone, MD ménadione et correspond à 2-méthyl NQ, Ub-0 Ubiquinone-0 correspond à 2,3-diméthoxy 5-méthyl BQ). La moyenne de 3 répétitions est exprimée \pm l'erreur standard. Chaque essai contient 0.2 mM NADH, 0.2 mM quinone, 0.2 μ g/ml NQR et du tampon 20 mM HEPES pH7.5

Quinone	Activité NQR (μ mol/mg/min)	Potentiel rédox (mV)
BQ	676.2 \pm 4.6	78
MD	522.7 \pm 7.8	-203
NQ	397.2 \pm 11.2	-140
Ub-0	559.1 \pm 15.6	-74

6.1.1.5 Activité de NQR avec différentes quinones

L'activité de NQR en présence de différentes quinones a été testée (tableau IX). Les quinones utilisées ont été choisies parmi une liste de substrats testés par Schopfer *et al.*, (2008) sur la NQR purifiée de soja. Les 4 quinones sont capables de servir de substrat à NQR et les activités obtenues sont élevées. Les activités en présence de BQ (1,4-benzoquinone) et de Ub-0 (2,3-diméthoxy 5-méthyl BQ) sont plus élevées que celles en présence de NQ (1,4-naphtoquinone) et MD (2-méthyl NQ). L'enzyme NQR a une activité plus élevée en présence de benzoquinones que de naphtoquinones. De plus, les benzoquinones ont des potentiels rédox plus élevés que les naphtoquinones ce qui semble indiquer que l'enzyme NQR a une meilleure affinité avec les quinones ayant un fort pouvoir oxydant.

6.1.2 Évaluation du FMN lié à NQR

6.1.2.1 Calcul du ratio protéine : FMN

Calculer le ratio des absorbances à 280 nm et 450 nm permet de connaître la proportion de protéine et de FMN dans l'échantillon. D'après mes spectres, cette valeur est d'environ 7. En supposant que le FMN des échantillons est lié à NQR, cela signifierait qu'il y a environ 15 % d'enzyme sous forme holoenzyme c'est-à-dire fonctionnelle. Les 85 % de NQR restant ne lieraient pas de FMN et seraient donc sous une forme apoenzyme, c'est-à-dire sous forme non réductible et non fonctionnelle.

Étant donné les activités élevées obtenues avec les différentes quinones dans les parties précédentes, il faut se demander si la mesure du ratio 280:450 permet effectivement d'obtenir la proportion de NQR liant du FMN. Les parties suivantes portant sur la dénaturation de NQR ainsi que la reconstitution de NQR en présence de FMN libre vont permettre de quantifier la proportion de FMN lié à NQR.

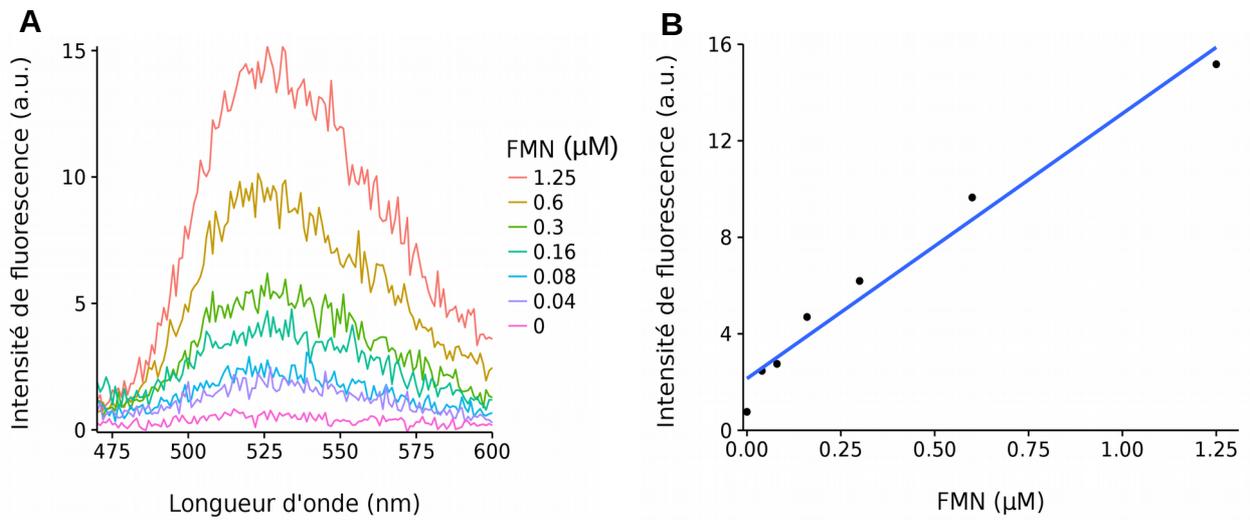


Figure 49 : Gamme de fluorescence du FMN : (A) spectres de fluorescence, (B) maximums de fluorescence reportés pour obtenir une droite étalon d'équation $y = 10.98x + 2.14$ ($R^2 = 0.98$).

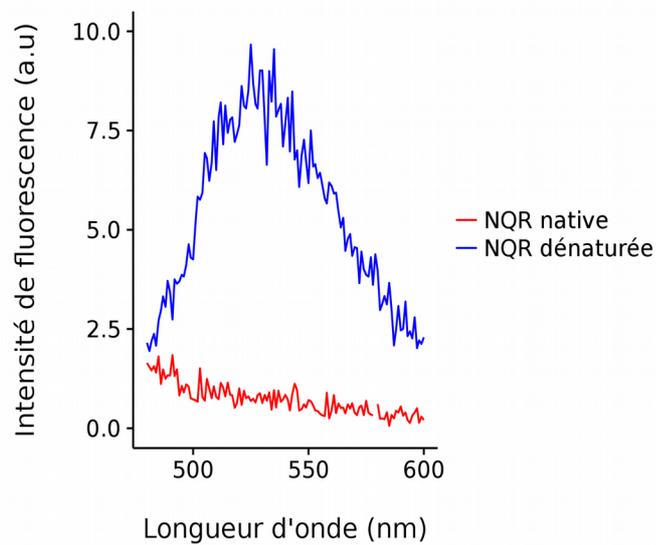


Figure 50 : Spectres de fluorescence de NQR à l'état natif et dénaturé par du SDS.

6.1.2.2 Dénaturation de NQR

Le FMN est un fluorophore qui peut être détecté facilement par spectroscopie. Cependant lorsqu'il est lié à une enzyme, la fluorescence n'est plus détectable (Bollen *et al.*, 2012). La seule façon de déterminer la quantité de FMN lié à l'enzyme est de la dénaturer (Aliverti *et al.*, 1999). Les liaisons non-covalentes existants entre l'enzyme NQR et le FMN vont ainsi être déstabilisées et cela va permettre la libération de FMN et son dosage.

Afin d'avoir une gamme étalon de fluorescence du FMN libre, une solution de FMN de concentration connue a été utilisée. La figure 49 A montre les spectres obtenus, il est visible que la fluorescence est corrélée à la concentration de FMN. Les maximums de chaque spectre ont été reportés pour tracer une droite étalon (figure 49 B).

Après avoir dénaturé NQR avec du SDS, des spectres de fluorescence sont mesurés (figure 50). La protéine NQR native montre une ligne de base, le FMN ne fluoresce pas au sein de la protéine. Après la dénaturation un spectre de fluorescence est obtenu avec un maximum à 525 nm. En utilisant l'équation obtenue grâce à la droite étalon (figure 49 B), cela donne 0.68 μM de FMN libéré à partir de 1 μM de NQR. Ainsi, il semble que 68 % des protéines NQR lient du FMN.

6.1.3 Reconstitution de NQR avec du FMN libre

6.1.3.1 Suivi de la reconstitution par fluorescence

Lostao *et al.*, (2000) ont réussi à reconstituer une flavodoxine avec du FMN libre et à suivre cela par fluorescence. De la même façon que pour la flavodoxine, le cofacteur FMN se lie de façon non covalente à NQR. Il est intéressant de tester si la reconstitution est possible dans ce cas. Pour ce faire, les spectres de fluorescence ont été mesurés pour 3 μM de FMN libre puis des quantités de NQR allant de 0.5 μM à 11 μM ont été ajoutées. La figure 51 A montre les spectres obtenus. Le spectre du FMN libre a une fluorescence maximale, puis l'ajout progressif de NQR permet de quencher le signal. Le quenching total est obtenu après avoir ajouté 10 μM de NQR. En faisant un ratio de la concentration de FMN libre ajouté au départ et de la concentration de NQR nécessaire au quenching du signal (3:10), on obtient la

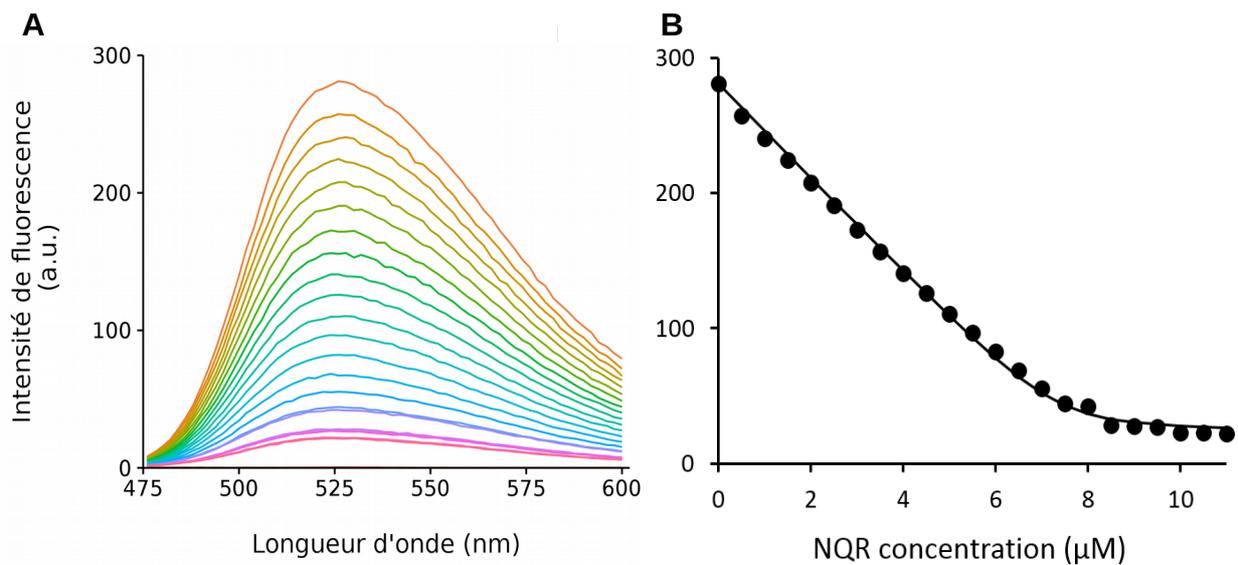
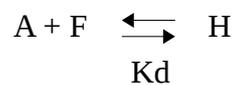


Figure 51 : Reconstitution de NQR avec du FMN libre suivie par fluorescence. (A) Spectres du FMN libre. Le spectre le plus haut est la spectre de 3 μM FMN libre, les spectres inférieurs ont été pris après l'ajout progressif de 0.5 à 11 μM de NQR. (B) Courbe d'association du FMN avec NQR. Les points représentent les maximums de (A) et la courbe est le meilleur ajustement des points mesurés .

concentration de FMN libre qui a été lié à NQR. En supposant que le FMN se lie à NQR sous forme apoenzyme, cela signifie que la reconstitution concerne 30 % des protéines.

Sur la figure 51 B, les maximums de chaque spectre de fluorescence ont été reportés donnant la courbe d'association du FMN et de NQR. La réaction entre NQR et FMN s'écrit :



où A est l'apoenzyme (NQR ne liant pas de FMN), F est le FMN libre, H est l'holoenzyme (enzyme liant le FMN) et K_d la constante de dissociation. Le calcul du K_d reflète l'affinité de NQR pour le FMN.

Il en découle :

$$K_d = \frac{[A][F]}{[H]}$$

En prenant en compte que, $A_t = A + H$ et

$$F_t = F + H,$$

avec A_t pour concentration en apoenzyme totale et F_t pour concentration de FMN total, on peut écrire :

$$K_d = \frac{[A_t - H][F_t - H]}{[H]}$$

L'expression peut être posée sous forme d'un polynôme du second degré afin d'en faciliter le calcul :

$$H^2 - H(A_t + F_t + K_d) + A_t F_t = 0$$

Le discriminant donne : $\Delta = (-(A_t + F_t + K_d))^2 - 4 A_t F_t$

Le discriminant Δ étant positif deux racines existent, les deux sont positives mais une seule est physiquement possible :

$$H = \frac{(A_t + F_t + K_d) - \sqrt{\Delta}}{2}$$

La concentration de FMN libre (F_t) varie donc en fonction de la concentration d'holoprotéine H :

$$F_t = [FMN_0] - H$$

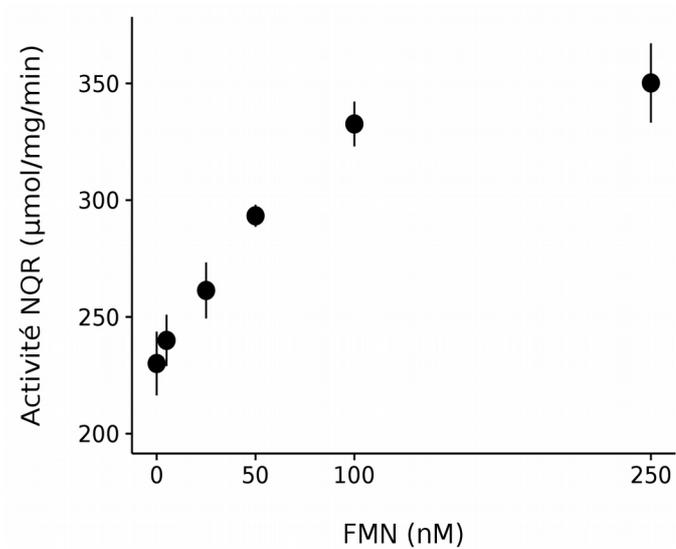


Figure 52 : Activité de NQR lors de la reconstitution avec du FMN libre. Les points représentent la moyenne de 4 répétitions \pm l'erreur standard.

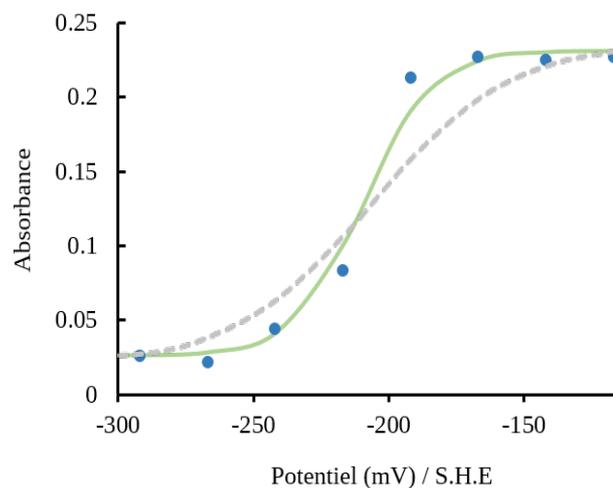


Figure 53 : Titration redox de NQR à pH 7.5. Les points bleus représentent les maximums à 450 nm des spectres mesurés pendant l'expérience. La courbe de Nernst a été ajustée en vert pour $n = 2$ et en pointillés gris pour $n = 1$.

où $[FMN_0]$ est la concentration de FMN ajoutée au début de l'expérience $[FMN_0] = 3 \mu M$.

La fluorescence théorique est calculée à partir de :

$$Fluo_{théorique} = (Ft Fluo_F) + (H Fluo_H)$$

L'outil Solveur d'Excel calcule la somme des carrés des écarts la plus faible possible entre la fluorescence mesurée avec la fluorescence théorique en estimant la valeur de K_d .

Le meilleur ajustement est obtenu pour $K_d = 30 \text{ nM}$ et une proportion d'apoenzyme de 0.41. Ce qui signifie que l'affinité de NQR pour son cofacteur FMN est forte.

6.1.3.2 Augmentation de l'activité de NQR après la reconstitution

La reconstitution de NQR avec du FMN libre devrait permettre, en théorie, d'augmenter l'activité de l'enzyme. La figure 52 montre l'activité de NQR en fonction de la concentration de FMN libre ajouté. Dès l'ajout de 25 nM de FMN libre, il y a une augmentation de presque 15 % d'activité. L'augmentation est progressive jusqu'à arriver à un plateau entre 100 et 250 nM de FMN. L'activité maximale obtenue après reconstitution est d'environ 350 $\mu\text{mol/mg/min}$. Cet accroissement représente 30 % de l'activité totale.

6.1.4 Titration rédox de NQR

6.1.4.1 Détermination du potentiel rédox par spectro-électrochimie

La titration rédox permet de déterminer le potentiel rédox d'une protéine. Le potentiel rédox reflète la capacité d'une protéine à accepter ou céder des électrons. Il permet également de savoir si le transfert d'électrons est possible d'une protéine à une autre.

La titration de NQR a été faite à partir d'une enzyme totalement réduite en allant vers une oxydation progressive (figure 53). Les courbes de Nernst à 1 électron (en pointillés gris) et 2 électrons (en vert) sont représentées par rapport aux points expérimentaux. Il est ici clair que c'est la courbe de Nernst à 2 électrons qui s'approche davantage des points expérimentaux, c'est le résultat qui est attendu lors de la titration d'une enzyme à FMN. Le

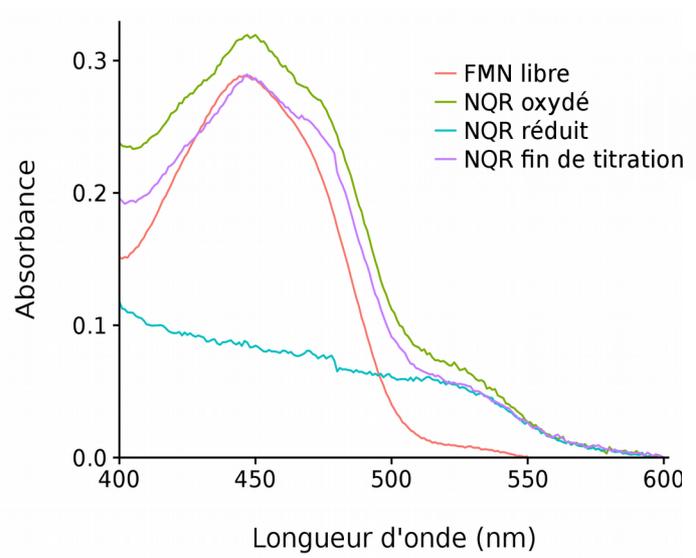


Figure 54 : Contrôle de l'état du FMN pendant la titration rédox de NQR par spectroscopie UV-visible.

potentiel de demi-vague estimé est de -200 mV ce qui est très proche du potentiel rédox estimé du FMN libre à -219 mV (pour la détermination de ce potentiel voir la partie 2.10.2).

6.1.4.2 Contrôle de l'état de liaison du FMN à NQR

Lors de l'arrêt de la titration de NQR, la solution protéique était trouble. Il semblerait que NQR ait précipité durant l'expérience. Il est probable qu'une partie de NQR se soit dénaturée et que du cofacteur ait pu être libéré. Cette information induit un doute quant à la molécule titrée : était-ce du FMN lié à NQR ou bien du FMN libre ? Pour éclaircir ce point, les spectres de NQR en début et fin d'expérimentation sont comparés au spectre du FMN libre sur la figure 54. La comparaison des spectres de NQR en début d'expérimentation en état réduit ou oxydé montre bien une disparition du maximum d'absorbance caractéristique du FMN à 450 nm. Il y a une légère différence de 10 % au niveau de l'amplitude des spectres de NQR oxydé en début de titration et en fin de titration, cette proportion représente probablement la partie de NQR précipitée. Le maximum d'absorbance de NQR en début et en fin de titration s'élève à 449 nm tandis qu'il est à 446 nm pour le FMN libre.

De plus, lorsque le FMN est lié à NQR, il existe un épaulement à 471 nm au niveau des spectres pris avant et après la titration. Cet épaulement est absent du spectre du FMN libre, il semble spécifique du FMN lié à NQR. Cette seconde preuve permet d'indiquer que le spectre mesuré correspond à du FMN lié à NQR.

6.2 Caractérisation de la protéine recombinante AtAIR12

La protéine recombinante AtAIR12 a été produite par l'équipe de Paolo Trost dans *Pichia pastoris* et purifiée selon les protocoles de Costa *et al.*, 2015.

L'objectif de cette partie est de déterminer si AIR12 peut être réduit par du dihydroménadione (MDH₂). Le résultat indiquera si le produit de la réaction catalysée par les QR est capable de réduire AIR12.

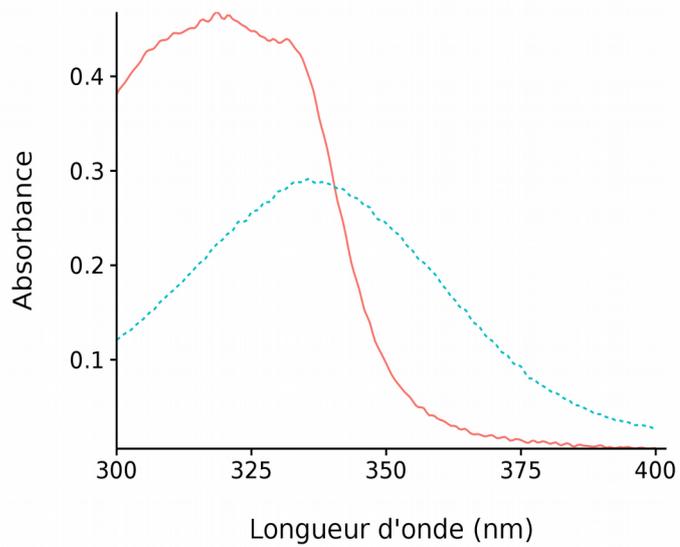


Figure 55 : Autooxydation immédiate du MDH₂ (200 μM) à pH alcalin. Le spectre rose en trait plein sont pris à pH 5.8, le MDH₂ est réduit. Le spectre bleu en pointillés est pris à pH 8.0, MDH₂ est oxydé en MD.

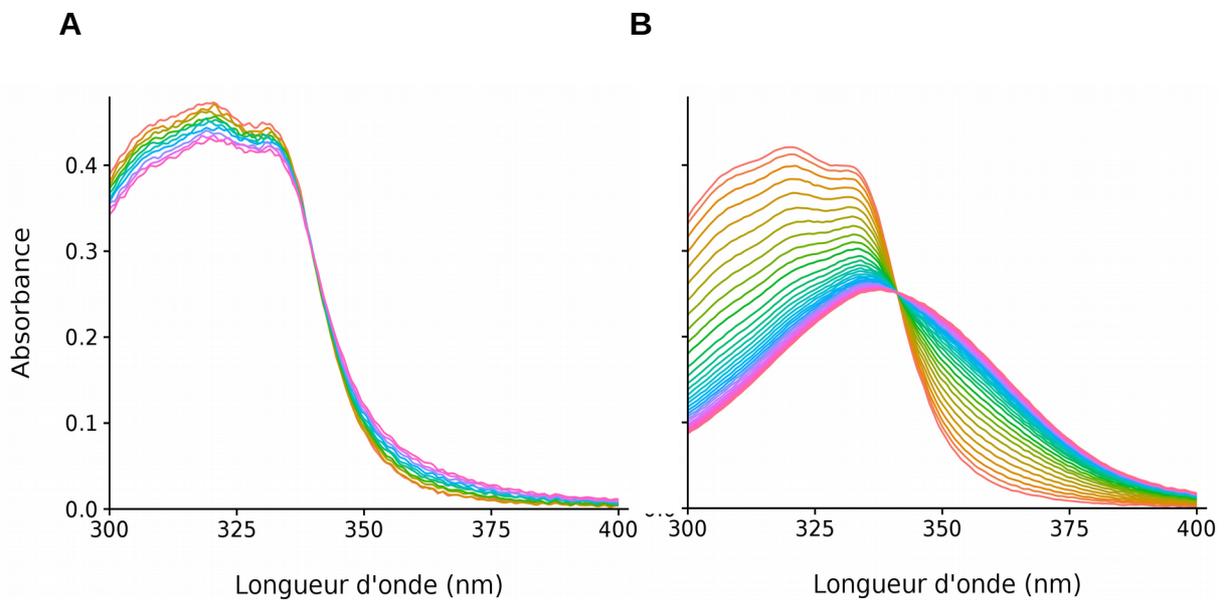


Figure 56 : Autooxydation du MDH₂ (200 μM) au cours du temps. (A) Les spectres sont pris à pH 5.8 toutes les 5 minutes pendant 1 heure. (B) Les spectres sont pris à pH 6.55 toutes les minutes pendant 1 heure.

6.2.1 Effet de AIR12 sur l'oxydation de MDH₂

6.2.1.1 Rôle du pH

Les dihydroquinones sont capables de s'autooxyder au-dessus de pH 6.5 (Schopfer *et al.*, 2008). Les expériences présentées ici servent à confirmer ce résultat.

Des spectres de MDH₂ ont été pris à deux pH (figure 55). A pH 5.8, le maximum du spectre d'absorbance est à 320 nm. Ce spectre est caractéristique du MDH₂, c'est-à-dire du MD dans son état réduit. A pH 8.0, le spectre a changé de forme et le maximum d'absorbance se trouve à 333 nm. Ce spectre est caractéristique de la MD, le MDH₂ s'est donc autooxydé à pH 8.0.

L'autooxydation de MDH₂ en MD à pH 8.0 a été immédiate ce qui rend impossible de la suivre dans le temps. Afin de ralentir la réaction, le pH a été abaissé à pH 6.55. Les spectres de l'autooxydation du MDH₂ au cours du temps sont montrés en figure 56. A pH 5.8, il y a une légère autooxydation au bout d'une heure. A pH 6.55, l'autooxydation est beaucoup plus rapide puisque le spectre correspondant à la MD est obtenu au bout de 20 minutes environ.

Le pH 6.55 ralentit l'autooxydation du MDH₂ en MD et cela permet de suivre la réaction.

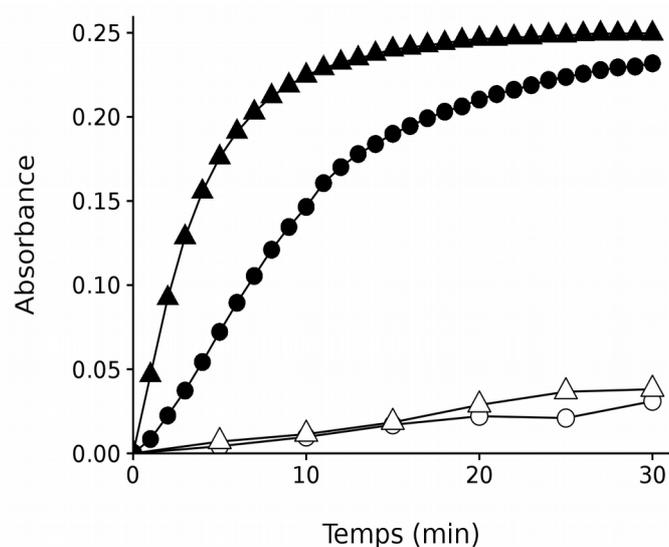


Figure 57 : Oxydation de MDH₂ (200 μM) à 320 nm en présence de AIR12 à différents pH. Les symboles blancs correspondent aux spectres pris à pH 5.8 et les symboles noirs aux spectres pris à pH 6.55. Les ronds représentent les spectres en l'absence de AIR12 et les triangles, en présence de AIR12 (40 nM).

Tableau X : Production de O₂⁻ en présence de membrane plasmique d'hypocotyle de soja (mb) et des protéines recombinantes NQR et AIR12 à pH 7.5. Les valeurs correspondent aux moyennes de 4 répétitions ± l'erreur standard. Les différentes lettres indiquent des différences significatives à P < 0.05. Chaque essai contient 50 μg de membrane plasmique, 10 nM NQR, 10 nM AIR12, 200 μM NADH, 500 μM XTT et 20 mM tampon Hepes pH 7.5.

Essai	Réduction du XTT (μmol/mg/h)
mb	4.1 ± 0.2 a
mb + NQR	5.7 ± 0.2 b
mb + NQR + AIR12	4.8 ± 0.1 c

6.2.1.2 Rôle de AIR12

Les conditions pour suivre l'autooxydation du MDH₂ ayant été trouvées, les expériences peuvent être réalisées en présence de AIR12. La figure 57 montre les cinétiques d'oxydation du MDH₂. A pH 5.8, que ce soit en présence ou en l'absence de AIR12, une autooxydation faiblement croissante et linéaire est observée. A pH 6.55, en l'absence de AIR12, la vitesse de la réaction est rapide et linéaire jusqu'à 12 minutes puis elle se stabilise. En présence de AIR12, la vitesse est deux à trois fois plus rapide qu'en l'absence de AIR12 jusqu'à 8 minutes puis elle se stabilise pour arriver à un plateau. La présence de AIR12 stimule la réaction d'autooxydation de MDH₂ en MD. Le MDH₂ n'a pas d'effet sur AIR12 tandis que MD²⁻ et MD⁻ sont capables de le réduire (voir la réaction figure 58).

6.3 Interaction de NQR et AIR12

Cette partie a pour objectif de déterminer s'il existe un flux d'électrons à travers des fragments de membranes plasmiques d'hypocotyles de soja et des protéines recombinantes NQR et AIR12. Étant donné que NQR produit du O₂⁻ (Schopfer *et al.*, 2008) et que AIR12 est réduit par du O₂⁻ (Costa *et al.*, 2015), la production de ce radical est mesurée.

Notre collaborateur Jerzy Kruk (Université de Cracovie) a pu identifier par HPLC les quinones des membranes plasmiques de soja (pour plus de détails voir annexe, article 1). Il s'agit de phylloquinones aussi appelées vitamines K1. Afin de pouvoir se rapprocher au maximum de conditions physiologiques, des fragments de membranes plasmiques d'hypocotyles de soja contenant des phylloquinones sont utilisés.

Le tableau X montre les résultats obtenus. En présence de la membrane plasmique seule, il y a une production de O₂⁻ de 4.1 µmol/mg/h. En ajoutant NQR, la production augmente significativement de presque 40 %. NQR est donc capable de catalyser la réaction de production de O₂⁻ en présence des phylloquinones membranaires. Lorsque AIR12 est ajouté en même temps que NQR la production est intermédiaire. Il semblerait que AIR12 interfère dans la production de O₂⁻ médiée par NQR au niveau de la membrane plasmique.

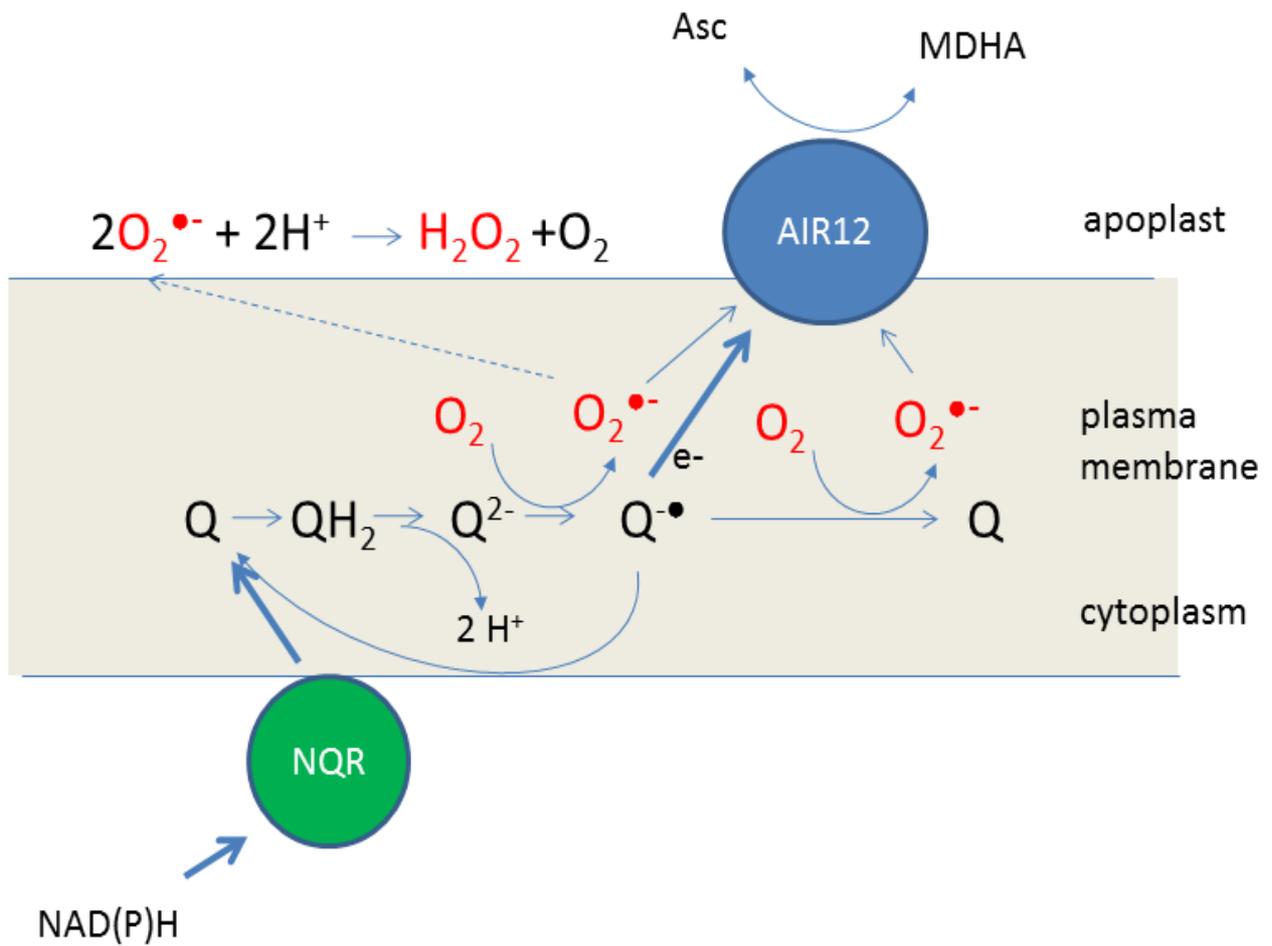


Figure 58 : Modèle de transfert d'électrons à partir de NAD(P)H cytosolique vers le monodéhydroascorbate (MDHA) en passant par NQR, la vitamine K et AIR12. NQR réduit les quinones (Q) en dihydroquinones (QH₂). Elles peuvent se déprotonner (Q²⁻) et réagir avec l'oxygène pour former du O₂^{•-} et des semiquinones (Q^{•-}). Les semiquinones pourraient transmettre leur électron surnuméraire à AIR12 ou à l'oxygène ce qui permettrait de régénérer les quinones. Le O₂^{•-} transfère un électron à AIR12 ou se dismute dans l'apoplaste en H₂O₂. AIR12 peut réduire de MDHA en ascorbate (Asc).

6.4 Discussion

La protéine AtNQR a été produite chez *E.coli* avec un bon rendement de 45 mg par litre de culture. L'enzyme produite possède un cofacteur flavine (figure 48). Ce résultat est cohérent avec les identifications faites sur NQR extraite de feuilles de tabac et contenant du FMN (Sparla *et al.*, 1996) et sur la protéine hétérologue produite dans *E.coli* (Sparla *et al.*, 1999). Le FMN est réductible (figure 48) et NQR est active et semble avoir une meilleure affinité pour les substrats de type benzoquinone (tableau IX).

Il est important de connaître la proportion de NQR produite liant le FMN soit la proportion de NQR active afin de déterminer la qualité de l'échantillon. La première mesure faite dans ce but a été la mesure du ratio des absorbances à 280 nm et 450 nm. Le résultat étant de 7, cela signifierait que seulement 15 % de l'enzyme est sous forme holo c'est-à-dire liant le cofacteur flavine. Ce résultat a été contredit par deux autres méthodes. Tout d'abord NQR a été dénaturée puis la fluorescence du FMN libéré a été mesurée (figures 49 et 50). Il a été déterminé que 1 μM de NQR lie 0.68 μM de FMN. Ainsi, quasiment 70 % de NQR lie le FMN. La seconde méthode a consisté à suivre par fluorescence la reconstitution de NQR avec du FMN libre (figure 51 A). 3 μM de FMN libre se sont liés à 10 μM de NQR ce qui signifie que la protéine a été reconstituée à 30 %. En supposant que la proportion de NQR reconstituée par le FMN libre est égale à la proportion de NQR sous forme apoprotéine au début de l'expérience, il semblerait que 70 % de NQR était sous forme holoprotéine avant l'expérience. Ce résultat est en accord avec celui obtenu suite à la dénaturation de NQR. Les résultats obtenus par ces deux méthodes contredisent celui du calcul du ratio 280:450. Il est nécessaire de remettre cette technique simple en question. Elle est d'autant plus discutable qu'elle a aussi été utilisée par Sparla *et al.*, 1996 sur la protéine NQR extraite à partir de feuilles de tabac et que le ratio calculé est le même que celui que j'ai obtenu. Ce qui signifierait que 85 % de la protéine NQR endogène est inactive, ce qui est plutôt improbable.

L'activité de NQR a pu être augmentée de 30 % grâce à la reconstitution avec du FMN libre (figure 52). Ce résultat est à nouveau en accord avec ce qui a été trouvé par les deux méthodes citées plus haut. Cela renforce l'idée que NQR est à 70 % sous une forme liant le FMN.

La constante de dissociation de NQR et du FMN est de 30 nM (figure 51 B). Cette valeur est très faible, ce qui signifie qu'il y a une faible proportion de FMN se dissociant de NQR. Par extension, l'affinité entre la protéine et son cofacteur est forte. Cette constante est la même que celle de la flavodoxine de la cyanobactérie *Anabaena* avec du FMN (Lostao *et al.*, 2000).

Il semble donc que le FMN ne se dissocie pas facilement de NQR étant donné que leur affinité est forte. Étant donné que NQR a été surexprimé de façon hétérologue, le problème des 30 % d'apoNQR peut provenir de la bactérie *E.coli*. Lors de la surexpression, la bactérie n'a peut-être pas synthétisé assez de FMN pour qu'il se lie à la protéine. L'induction a été faite à 25°C. En diminuant encore la température (à 18°C par exemple), la synthèse sera plus lente et cela limitera peut-être le défaut de production ou de liaison éventuel de FMN. Cette procédure est bien connue pour optimiser les rendements de production de protéines hétérologues (Sorensen *et al.*, 2005, Rosano *et al.*, 2014).

La titration rédox de NQR a permis de déterminer son potentiel de demi-vague à -200 mV (figure 53). Ce potentiel est très proche de celui du FMN libre, -219 mV. Les potentiels rédox de protéine à flavine à 2 électrons sont très variables, allant de -129 mV pour la sous-unité G de la ferredoxine-NAD⁺-réductase (Rnf) d'Archée (Suharti *et al.*, 2014) à -350 mV pour une NADH:Ubiquinone oxydoréductase d'*E.coli* (Euro *et al.*, 2008). Le potentiel de NQR semble donc être cohérent par rapport à ces données. À la fin de la titration, un contrôle de l'état du FMN a été effectué (figure 54). Un shift de 3 nm a été retrouvé entre le maximum d'absorbance du FMN libre et de NQR en fin de titration. Lewis et Escalante-Semerena (2006) ont montré qu'il peut y avoir un shift à 455 nm de ce pic dans une tricarballylate déhydrogénase de *Salmonella* à FAD. Il est probable que cela arrive aussi pour le FMN lié à NQR.

AIR12 est capable d'accélérer l'autooxydation du MDH₂ en MD (figure 57). Il est possible que le transfert d'électrons de semiquinones vers AIR12 catalysent l'autooxydation des dihydroquinones. La production de O₂⁻ par la membrane plasmique d'hypocotyle de soja (tableau X) est augmentée de 40 % lors de l'ajout de NQR et elle est diminuée lors de l'ajout de AIR12. AIR12 semble interférer dans la production de O₂⁻ par NQR au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, il en résulte que NQR réduit des phylloquinones en dihydroquinones. Les dihydroquinones sont capables de s'autooxyder plus efficacement en présence de AIR12 ce qui laisse penser que AIR12 pourrait être réduit par les semiquinones.

Ce transfert vers AIR12 induit un détournement des électrons ce qui diminue la production de O_2^- . Il faut noter que AIR12 peut aussi être réduit par l'ascorbate et le O_2^- .

La figure 58 représente le modèle d'interaction de NQR et AIR12 au niveau de la membrane plasmique. NQR utilise le NAD(P)H comme donneur d'électrons pour réduire une quinone en dihydroquinone. La dihydroquinone est déprotonée et s'autooxyde en semiquinone en donnant du O_2^- . La semiquinone et le O_2^- sont capables de réduire AIR12. Cela conduit à la régénération d'une quinone. Le O_2^- peut traverser la membrane pour rejoindre l'apoplaste où il pourra être dismuté pour donner du H_2O_2 . AIR12 peut régénérer l'ascorbate au niveau de l'apoplaste en réduisant le monodéhydroascorbate.

7. Perspectives

Les résultats et les discussions exposés dans ce travail permettent de dégager plusieurs perspectives.

La troisième partie a porté sur le rôle des QR dans la germination et le développement précoce d'*A.thaliana*. Au niveau de la germination, les graines KO de QR ne montrent pas de phénotype. Cependant, la production de ROS dans les graines est affectée étant donné que les mutants *nqr*, *fqr1* et *nqrfqr1* produisent plus de O_2^- et le mutant *nqr* produit plus de H_2O_2 . Le développement des plantes est comparable au sauvage et les activités d'enzymes anti-oxydantes sont peu affectées. Ces résultats sont globalement peu contrastés. Il est possible que les QR soient particulièrement activées lors d'un stress biotique, comme lors de l'attaque de champignons comme l'a montré Heyno et al., (2013).

Les QR ne sont pas les seules enzymes impliquées dans la production de O_2^- , les NADPH oxydases le sont aussi et leur rôle comme enzyme productrice de O_2^- est accepté. De ce fait, il peut exister des compensations de production de O_2^- chez les mutants KO. Il serait intéressant de construire les lignées de mutants KO au niveau de QR et de certaines isoformes de la NADPH oxydase. Par exemple pour l'étude du rôle du O_2^- dans la germination, un mutant intéressant à étudier serait un mutant délété dans toutes les QR ainsi que des NADPH oxydases B et D. Un autre travail consiste à comparer l'expression de protéines impliquées dans la production de ROS (pro-oxydantes : AO, OXO, PRX, NADPH oxydases et anti-oxydantes : CAT, SOD, PRX, GR, MDHAR, DHAR, GR) pour détecter d'éventuelles compensations à ce niveau. La germination a été particulièrement étudiée au niveau de ces interactions ROS/ hormones (Diaz-Vivancos *et al.*, 2013). De simples tests de germination et de croissance en présence d'hormones permettraient de déterminer si les mutants QR ont un phénotype affecté. Encore une fois, des expériences de RT-qPCR pourraient déterminer si des enzymes pro- ou anti-oxydantes sont plus ou moins exprimées en présence d'hormones chez ces mutants. L'accent devrait être mis sur l'effet de l'auxine étant donné que FQR1 est un gène de réponse à cette hormone (Laskowki *et al.*, 2002). En plus, il serait intéressant de déterminer le contenu en auxine et d'autres hormones dans les mutants.

Les perspectives sont assez semblables pour la partie portant sur le rôle de NQR et AIR12 dans la germination et le développement précoce d'*A.thaliana*. En effet, tout comme FQR1, AIR12 est aussi un gène de réponse à l'auxine (Laskowski *et al.*, 2006). De plus, le mutant *air12* semble comme le mutant *nqr* influencer sur l'état rédox des plantes suite à l'infection par des champignons (Costa *et al.*, 2015). Pour l'ensemble des mutants il serait

nécessaire de construire des lignées de réinsertion à étudier en même temps que les mutants KO, cela permettrait de vérifier que le phénotype observé est bien dû à la mutation.

La partie portant sur l'interaction de NQR et de AIR12 au niveau de la membrane plasmique pourrait être approfondie. Le système utilisé contient des fragments de membrane plasmique d'hypocotyles de soja. Ils contiennent un grand nombre de protéines qui n'ont pas toujours de rôle défini et qui peuvent parasiter les mesures. La construction de liposomes contenant la vitamine K1 ainsi que les protéines NQR et AIR12 permettrait d'avoir un système propre ne contenant que les partenaires à tester. Le suivi de l'absorbance du cofacteur FMN de NQR ainsi que du cytochrome AIR12 en parallèle permettrait de définir l'état redox des deux protéines et de vérifier s'il existe bien un flux d'électrons au sein de la membrane des liposomes. Ensuite, les liposomes pourraient être construits de façon à reproduire la composition de rafts lipidiques. Cela permettrait de caractériser ce transfert d'électrons dans des conditions optimales et reflétant mieux les conditions *in vivo*.

Références bibliographiques

- Aliverti, A., Curti, B., and Vanoni, M.A. (1999). Identifying and quantitating FAD and FMN in simple and in iron-sulfur-containing flavoproteins. *Methods Mol. Biol.* *131*, 9–23.
- Angelini, R., Cona, A., Federico, R., Fincato, P., Tavladoraki, P., and Tisi, A. (2010). Plant amine oxidases “on the move”: an update. *Plant Physiol. Biochem.* *48*, 560–564.
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* *55*, 373–399.
- Asada, K. (1999). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *50*, 601–639.
- Asard, H., Kapila, J., Verelst, W., and Bérczi, A. (2001). Higher-plant plasma membrane cytochrome b561: a protein in search of a function. *Protoplasma* *217*, 77–93.
- Asard, H., Barbaro, R., Trost, P., and Bérczi, A. (2013). Cytochromes b561: ascorbate-mediated trans-membrane electron transport. *Antioxid. Redox Signal.* *19*, 1026–1035.
- Baek, D., Cha, J.-Y., Kang, S., Park, B., Lee, H.-J., Hong, H., Chun, H.J., Kim, D.H., Kim, M.C., Lee, S.Y., et al. (2015). The Arabidopsis a zinc finger domain protein ARS1 is essential for seed germination and ROS homeostasis in response to ABA and oxidative stress. *Front Plant Sci* *6*, 963.
- Bahin, E., Bailly, C., Sotta, B., Kranner, I., Corbineau, F., and Leymarie, J. (2011). Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ.* *34*, 980–993.
- Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* *14*, 93–107.

- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., and Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* 331, 806–814.
- Barth, C., Moeder, W., Klessig, D.F., and Conklin, P.L. (2004). The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant vitamin c-1. *Plant Physiol.* 134, 1784–1792.
- Bartoli, C.G., Casalongué, C.A., Simontacchi, M., Marquez-Garcia, B., and Foyer, C.H. (2013). Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany* 94, 73–88.
- Baxter, A., Mittler, R., and Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* 65, 1229–1240.
- Benech-Arnold, R.L., Gualano, N., Leymarie, J., Côme, D., and Corbineau, F. (2006). Hypoxia interferes with ABA metabolism and increases ABA sensitivity in embryos of dormant barley grains. *J. Exp. Bot.* 57, 1423–1430.
- Bentsink, L., Jowett, J., Hanhart, C.J., and Koornneef, M. (2006). Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17042–17047.
- Bérczi, A., and Møller, I.M. (2000). Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles. *Plant, Cell & Environment* 23, 1287–1302.
- Bewley, J.D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9, 1055–1066.
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. 2013. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. New York: Springer.
- Bienert, G.P., and Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1596–1604.
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 994–1003.

- Blokhina, O., and Fagerstedt, K.V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiol Plant* 138, 447–462.
- Bollen, Y.J.M., Westphal, A.H., Lindhoud, S., van Berkel, W.J.H., and van Mierlo, C.P.M. (2012). Distant residues mediate picomolar binding affinity of a protein cofactor. *Nat Commun* 3, 1010.
- Borner, G.H.H., Lilley, K.S., Stevens, T.J., and Dupree, P. (2003). Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol.* 132, 568–577.
- Borner, G.H.H., Sherrier, D.J., Weimar, T., Michaelson, L.V., Hawkins, N.D., Macaskill, A., Napier, J.A., Beale, M.H., Lilley, K.S., and Dupree, P. (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* 137, 104–116.
- Bottin, H., and Lagoutte, B. (1992). Ferredoxin and flavodoxin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1101, 48–56.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cairns, N.G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C.S., and Meyer, A.J. (2006). Maturation of arabidopsis seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol.* 141, 446–455.
- Carey, J., Brynda, J., Wolfová, J., Grandori, R., Gustavsson, T., Etrich, R., and Smatanová, I.K. (2007). WrbA bridges bacterial flavodoxins and eukaryotic NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Protein Sci.* 16, 2301–2305.
- Chareonthiphakorn, N., Wititsuwannakul, D., Golan-Goldhirsh, A., and Wititsuwannakul, R. (2002). Purification and characterization of NAD(P)H quinone reductase from the latex of *Hevea brasiliensis* Müll.-Arg. (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 61, 123–128.

- Chen, C., Letnik, I., Hacham, Y., Dobrev, P., Ben-Daniel, B.-H., Vanková, R., Amir, R., and Miller, G. (2014). ASCORBATE PEROXIDASE6 protects Arabidopsis desiccating and germinating seeds from stress and mediates cross talk between reactive oxygen species, abscisic acid, and auxin. *Plant Physiol.* 166, 370–383.
- Cheng, Y., Qi, Y., Zhu, Q., Chen, X., Wang, N., Zhao, X., Chen, H., Cui, X., Xu, L., and Zhang, W. (2009). New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. *Proteomics* 9, 3100–3114.
- Chiang, G.C.K., Bartsch, M., Barua, D., Nakabayashi, K., Debieu, M., Kronholm, I., Koornneef, M., Soppe, W.J.J., Donohue, K., and De Meaux, J. (2011). DOG1 expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Ecol.* 20, 3336–3349.
- Considine, M.J., and Foyer, C.H. (2014). Redox regulation of plant development. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1305–1326.
- Costa, A., Barbaro, M.R., Sicilia, F., Preger, V., Krieger-Liszkay, A., Sparla, F., De Lorenzo, G., and Trost, P. (2015). AIR12, a b-type cytochrome of the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* is a negative regulator of resistance against *Botrytis cinerea*. *Plant Sci.* 233, 32–43.
- Crowe, J.H., McKersie, B.D., and Crowe, L.M. (1989). Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 979, 7–10.
- Das, K., and Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Env. Sci.* 2,53.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M., and Bolwell, G.P. (2012). The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity. *Plant Cell* 24, 275–287.
- Davidson, R.M., Reeves, P.A., Manosalva, P.M., and Leach, J.E. (2009). Germins: A diverse protein family important for crop improvement. *Plant Science* 177, 499–510.

- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K.M., and Koornneef, M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *122*, 403–414.
- Deller, S., Macheroux, P., and Sollner, S. (2008). Flavin-dependent quinone reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 141–160.
- Diaz-Vivancos, P., Barba-Espín, G., and Hernández, J.A. (2013). Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. *Plant Cell Rep.* *32*, 1491–1502.
- Dinkova-Kostova, A.T., and Talalay, P. (2000). Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* *29*, 231–240.
- Dinkova-Kostova, A.T., and Talalay, P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.* *501*, 116–123.
- El-Maarouf-Bouteau, H., and Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal Behav* *3*, 175–182.
- El-Maarouf-Bouteau, H., Sajjad, Y., Bazin, J., Langlade, N., Cristescu, S.M., Balzergue, S., Baudouin, E., and Bailly, C. (2015). Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant Cell Environ.* *38*, 364–374.
- Ernster, L., Danielson, L., and Ljunggren, M. (1962). DT diaphorase. I. Purification from the soluble fraction of rat-liver cytoplasm, and properties. *Biochim. Biophys. Acta* *58*, 171–188.
- Ernster, L., and Navazio, F. (1958). Soluble diaphorase in animal tissues. *Acta Chem Scand.* *12*:595-5.
- Euro, L., Bloch, D.A., Wikström, M., Verkhovsky, M.I., and Verkhovskaya, M. (2008). Electrostatic interactions between FeS clusters in NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* *47*, 3185–3193.

- Finch-Savage, W.E., and Bassel, G.W. (2016). Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *J. Exp. Bot.* *67*, 567–591.
- Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* *171*, 501–523.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., et al. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* *422*, 442–446.
- Foyer, C.H., and Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 861–905.
- Fry, S.C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem. J.* *332 (Pt 2)*, 507–515.
- Gallie, D.R. (2013). The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *J. Exp. Bot.* *64*, 433–443.
- Gibson, S.W., and Todd, C.D. (2015). Arabidopsis AIR12 influences root development. *Physiol Mol Biol Plants* *21*, 479–489.
- Gill, S.S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* *48*, 909–930.
- Greenshields, D.L., Liu, G., Selvaraj, G., and Wei, Y. (2005). Differential regulation of wheat quinone reductases in response to powdery mildew infection. *Planta* *222*, 867–875.
- Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.-H., Grunwald, D., and Macherel, D. (2005). Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.* *137*, 157–167.
- Heyno, E., Mary, V., Schopfer, P., and Krieger-Liszkay, A. (2011). Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. *Planta* *234*, 35–45.
- Heyno, E., Alkan, N., and Fluhr, R. (2013). A dual role for plant quinone reductases in host-fungus interaction. *Physiol Plant* *149*, 340–353.

- Holländer-Czytko, H., Grabowski, J., Sandorf, I., Weckermann, K., and Weiler, E.W. (2005). Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in *Arabidopsis* under stress conditions. *J. Plant Physiol.* *162*, 767–770.
- Imlay, J.A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* *57*, 395–418.
- Jonas, K., Tomenius, H., Römling, U., Georgellis, D., and Melefors, O. (2006). Identification of YhdA as a regulator of the *Escherichia coli* carbon storage regulation system. *FEMS Microbiol. Lett.* *264*, 232–237.
- Kärkönen, A., and Kuchitsu, K. (2015). Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* *112*, 22–32.
- Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aus. J. Crop. Sci.* *5*, 709–725.
- Kaya, H., Nakajima, R., Iwano, M., Kanaoka, M.M., Kimura, S., Takeda, S., Kawarazaki, T., Senzaki, E., Hamamura, Y., Higashiyama, T., et al. (2014). Ca²⁺-activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell* *26*, 1069–1080.
- Kendall, S.L., Hellwege, A., Marriot, P., Whalley, C., Graham, I.A., and Penfield, S. (2011). Induction of dormancy in *Arabidopsis* summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. *Plant Cell* *23*, 2568–2580.
- Kibinza, S., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J.M., Corbineau, F., and El-Maarouf-Bouteau, H. (2011). Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Sci.* *181*, 309–315.
- Kierszniowska, S., Seiwert, B., and Schulze, W.X. (2009). Definition of *Arabidopsis* sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-beta-cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol. Cell Proteomics* *8*, 612–623.
- Kocsy, G., Tari, I., Vanková, R., Zechmann, B., Gulyás, Z., Poór, P., and Galiba, G. (2013). Redox control of plant growth and development. *Plant Sci.* *211*, 77–91.

- Kong, L., Huo, H., and Mao, P. (2015). Antioxidant response and related gene expression in aged oat seed. *Front Plant Sci* 6, 158.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangel, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G., and Schroeder, J.I. (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 22, 2623–2633.
- Lane, B.G. (1994). Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB J.* 8, 294–301.
- Laskowski, M., Biller, S., Stanley, K., Kajstura, T., and Prusty, R. (2006). Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiol.* 47, 788–792.
- Laskowski, M.J., Dreher, K.A., Gehring, M.A., Abel, S., Gensler, A.L., and Sussex, I.M. (2002). FQR1, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase. *Plant Physiol.* 128, 578–590.
- Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M.-A., Michaelson, L.V., Carde, J.-P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J.A., Cullimore, J., Bessoule, J.-J., et al. (2007). Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol.* 144, 402–418.
- Lehner, A., Mamadou, N., Poels, P., Côme, D., Bailly, C., and Corbineau, F. (2008). Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. *Journal of Cereal Science* 47, 555–565.
- Lewis, J.A., and Escalante-Semerena, J.C. (2006). The FAD-dependent tricarballylate dehydrogenase (TcuA) enzyme of *Salmonella enterica* converts tricarballylate into cis-aconitate. *J. Bacteriol.* 188, 5479–5486.
- Leymarie, J., Vitkauskaitė, G., Hoang, H.H., Gendreau, E., Chazoule, V., Meimoun, P., Corbineau, F., El-Maarouf-Bouteau, H., and Bailly, C. (2012). Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. *Plant Cell Physiol.* 53, 96–106.

- Lind, C., Hochstein, P., and Ernster, L. (1982). DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation. *Arch. Biochem. Biophys.* *216*, 178–185.
- Liszskay, A., Kenk, B., and Schopfer, P. (2003). Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* *217*, 658–667.
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., and Zhang, J. (2010). H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *J. Exp. Bot.* *61*, 2979–2990.
- Lostao, A., El Harrou, M., Daoudi, F., Romero, A., Parody-Morreale, A., and Sancho, J. (2000). Dissecting the energetics of the apoflavodoxin-FMN complex. *J. Biol. Chem.* *275*, 9518–9526.
- Luster, D.G., and Buckhout, T.J. (1989). Purification and Identification of a Plasma Membrane Associated Electron Transport Protein from Maize (*Zea mays* L.) Roots. *Plant Physiol.* *91*, 1014–1019.
- Lüthje, S. (2008). Plasma Membrane Redox Systems: Lipid Rafts and Protein Assemblies. In *Progress in Botany*, U. Lüttge, W. Beyschlag, and J. Murata, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 169–200.
- Lüthje, S., Möller, B., Perrineau, F.C., and Wöltje, K. (2013). Plasma membrane electron pathways and oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 2163–2183.
- MacGregor, D.R., Kendall, S.L., Florance, H., Fedi, F., Moore, K., Paszkiewicz, K., Smirnoff, N., and Penfield, S. (2015). Seed production temperature regulation of primary dormancy occurs through control of seed coat phenylpropanoid metabolism. *New Phytol.* *205*, 642–652.
- Manaa, A., Ben Ahmed, H., Valot, B., Bouchet, J.-P., Aschi-Smiti, S., Causse, M., and Faurobert, M. (2011). Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. *J. Exp. Bot.* *62*, 2797–2813.
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., and Pauly, N. (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.* *17*, 9–15.

- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.-T., Santoni, V., Shahzad, Z., and Verdoucq, L. (2015). Aquaporins in Plants. *Physiol. Rev.* *95*, 1321–1358.
- Mayhew, S.G. (1978). The redox potential of dithionite and SO₂ from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. *Eur. J. Biochem.* *85*, 535–547.
- Morel, J., Claverol, S., Mongrand, S., Furt, F., Fromentin, J., Bessoule, J.-J., Blein, J.-P., and Simon-Plas, F. (2006). Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol. Cell Proteomics* *5*, 1396–1411.
- Morscher, F., Kranner, I., Arc, E., Bailly, C., and Roach, T. (2015). Glutathione redox state, tocochromanols, fatty acids, antioxidant enzymes and protein carbonylation in sunflower seed embryos associated with after-ripening and ageing. *Ann. Bot.* *116*, 669–678.
- Müller, K., Carstens, A.C., Linkies, A., Torres, M.A., and Leubner-Metzger, G. (2009a). The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening. *New Phytol.* *184*, 885–897.
- Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, R.A.M., Fry, S.C., Krieger-Liszkay, A., and Leubner-Metzger, G. (2009b). In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol.* *150*, 1855–1865.
- Noctor, G. (2006). Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ.* *29*, 409–425.
- Nonogaki, H., Bassel, G.W., and Bewley, J.D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science* *179*, 574–581.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Finch, P., Butt, V.S., Whitelegge, J.P., Souda, P., Ausubel, F.M., and Bolwell, G.P. (2012). A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured Arabidopsis cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiol.* *158*, 2013–2027.
- Ogé, L., Bourdais, G., Bove, J., Collet, B., Godin, B., Granier, F., Boutin, J.-P., Job, D., Jullien, M., and Grappin, P. (2008). Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1

- is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 3022–3037.
- Okuyama, E., Yamamoto, R., Ichikawa, Y., and Tsubaki, M. (1998). Structural basis for the electron transfer across the chromaffin vesicle membranes catalyzed by cytochrome b561: analyses of cDNA nucleotide sequences and visible absorption spectra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1383, 269–278.
- Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Farrant, J.M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., Job, D., Corbineau, F., and Bailly, C. (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J.* 50, 452–465.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F., and Bailly, C. (2009). The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol.* 150, 494–505.
- Passardi, F., Penel, C., and Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 9, 534–540.
- Pasternak, M., Lim, B., Wirtz, M., Hell, R., Cobbett, C.S., and Meyer, A.J. (2008). Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *Plant J.* 53, 999–1012.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniw, J., Alvarez, M.E., and Foyer, C.H. (2005). Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 1291–1303.
- Preger, V., Tango, N., Marchand, C., Lemaire, S.D., Carbonera, D., Di Valentin, M., Costa, A., Pupillo, P., and Trost, P. (2009). Auxin-responsive genes AIR12 code for a new family of plasma membrane b-type cytochromes specific to flowering plants. *Plant Physiol.* 150, 606–620.
- Rajjou, L., and Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *C. R. Biol.* 331, 796–805.

- Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S.P.C., Belghazi, M., Job, C., and Job, D. (2008). Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiol.* 148, 620–641.
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., and Job, D. (2012). Seed germination and vigor. *Annu Rev Plant Biol* 63, 507–533.
- Räsänen, K., and Kruuk, L.E.B. (2007). Maternal effects and evolution at ecological time-scales. *Functional Ecology* 21, 408–421.
- Ratajczak, E., Małecka, A., Bagniewska-Zadworna, A., and Kalemba, E.M. (2015). The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *J. Plant Physiol.* 174, 147–156.
- Renew, S., Heyno, E., Schopfer, P., and Liskay, A. (2005). Sensitive detection and localization of hydroxyl radical production in cucumber roots and Arabidopsis seedlings by spin trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Plant J.* 44, 342–347.
- del Río, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gómez, M., and Barroso, J.B. (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot.* 53, 1255–1272.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Altomare, D.A., and Zilinskas, B.A. (2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 54, 923–933.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., and Barroso, J.B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.* 141, 330–335.
- Rodríguez, A.A., Maiale, S.J., Menéndez, A.B., and Ruiz, O.A. (2009). Polyamine oxidase activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. *J. Exp. Bot.* 60, 4249–4262.
- Rosano, G.L., and Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5, 172.

- Rouhier, N., Cerveau, D., Couturier, J., Reichheld, J.-P., and Rey, P. (2015). Involvement of thiol-based mechanisms in plant development. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 1479–1496.
- Rover Júnior, L., Fernandes, J.C., de Oliveira Neto, G., Kubota, L.T., Katekawa, E., and Serrano, S.H. (1998). Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design. *Anal. Biochem.* 260, 50–55.
- Rybinski, W., Blaszczyk, W., and Fornal, J. (2006). Seed microstructure and genetic variation of characters in selected grass-pea mutants (*Lathyrus sativus* L.). *Inter.Agrophysics.* 20, 317-326.
- Sagi, M., and Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* 141, 336–340.
- Schopfer, P., Plachy, C., and Frahry, G. (2001). Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 125, 1591–1602.
- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahry, G., and Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214, 821–828.
- Schopfer, P., Heyno, E., Drepper, F., and Krieger-Liskay, A. (2008). Naphthoquinone-dependent generation of superoxide radicals by quinone reductase isolated from the plasma membrane of soybean. *Plant Physiol.* 147, 864–878.
- Schweikert, C., Liskay, A., and Schopfer, P. (2000). Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry* 53, 565–570.
- Sharma, P., and Dubey, R.S. (2004). Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Science* 167, 541–550.
- Singh, K.L., Chaudhuri, A., and Kar, R.K. (2015). Role of peroxidase activity and Ca(2+) in axis growth during seed germination. *Planta* 242, 997–1007.

- Song, X., Fang, J., Han, X., He, X., Liu, M., Hu, J., and Zhuo, R. (2016). Overexpression of quinone reductase from *Salix matsudana* Koidz enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 576, 520–527.
- Sørensen, H.P., and Mortensen, K.K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 4, 1.
- Sparla, F., Tedeschi, G., and Trost, P. (1996a). NAD(P)H:(Quinone-Acceptor) Oxidoreductase of Tobacco Leaves Is a Flavin Mononucleotide-Containing Flavoenzyme. *Plant Physiol.* 112, 249–258.
- Sparla, F., Tedeschi, G., and Trost, P. (1996b). NAD(P)H:(Quinone-Acceptor) Oxidoreductase of Tobacco Leaves Is a Flavin Mononucleotide-Containing Flavoenzyme. *Plant Physiol.* 112, 249–258.
- Sparla, F., Tedeschi, G., Pupillo, P., and Trost, P. (1999). Cloning and heterologous expression of NAD(P)H:quinone reductase of *Arabidopsis thaliana*, a functional homologue of animal DT-diaphorase. *FEBS Lett.* 463, 382–386.
- Springthorpe, V., and Penfield, S. (2015). Flowering time and seed dormancy control use external coincidence to generate life history strategy. *Elife* 4.
- Suharti, S., Wang, M., de Vries, S., and Ferry, J.G. (2014). Characterization of the RnfB and RnfG subunits of the Rnf complex from the archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PLoS ONE* 9, e97966.
- Sullivan, J.A., and Deng, X.W. (2003). From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev. Biol.* 260, 289–297.
- Sung, J.M., and Chiu, C.C. (1995). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Science* 110, 45–52.
- Torres, M.A., and Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 397–403.
- Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D. (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J.* 14, 365–370.

- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 517–522.
- Trost, P., Bonora, P., Scagliarini, S., and Pupillo, P. (1995). Purification and properties of NAD(P)H: (quinone-acceptor) oxidoreductase of sugarbeet cells. *Eur. J. Biochem.* 234, 452–458.
- Trost, P., Foscarini, S., Preger, V., Bonora, P., Vitale, L., and Pupillo, P. (1997). Dissecting the Diphenylene Iodonium-Sensitive NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase of Zucchini Plasma Membrane. *Plant Physiol.* 114, 737–746.
- Vleeshouwers, L.M., Bouwmeester, H.J., and Karssen, C.M. (1995). Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. *Journal of Ecology.* 83, 1031-1037.
- Wang, Y., Ying, Y., Chen, J., and Wang, X. (2004). Transgenic Arabidopsis overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Science.*
- Wu, J.T., Wu, L.H., and Knight, J.A. (1986). Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clin. Chem.* 32, 314–319.
- Xia, X.-J., Zhou, Y.-H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C.H., and Yu, J.-Q. (2015). Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 66, 2839–2856.
- Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2004). Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of Arabidopsis thaliana seeds. *Plant Cell* 16, 367–378.
- Yin, G., Xin, X., Song, C., Chen, X., Zhang, J., Wu, S., Li, R., Liu, X., and Lu, X. (2014). Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed. *Plant Physiol. Biochem.* 80, 1–9.

Annexes

Article 1

Dans cet article j'ai réalisé la caractérisation des mutants d'*A.thaliana* (croissance des plantes, dosages de ROS et d'activité enzymatique), la cinétique d'oxydation de MDH2 par AIR12 ainsi que les mesures de potentiels de NQR. L'ensemble de ces résultats est présenté dans les parties 5 et 6. L'article a été publié en décembre 2016 dans la revue *Planta*.

Biniak C, Heyno E, Kruk J, Sparla F, Trost P, Krieger-Liszkay A (2016) Role of the NAD(P)H quinone oxidoreductase NQR and the cytochrome b AIR12 in controlling superoxide generation at the plasma membrane. *Planta* 2016 Dec 28. La version ci-dessous est une version de travail antérieure.

Role of the NAD(P)H quinone oxidoreductase NQR and the cytochrome b AIR12 in controlling superoxide generation at the plasma membrane

Catherine Biniak¹, Eiri Heyno², Jerzy Kruk³, Francesca Sparla⁴, Paolo Trost⁴, Anja Krieger-Liszkay^{1,*}

¹Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), IBITECS, CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France

²Biochemie der Pflanzen, Ruhr-Universität Bochum, Universitätsstr. 150, 44801 Bochum, Germany

³Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, Poland

⁴Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FABIT), Università di Bologna, Via Imerio 42, 40126 Bologna, Italy

*Corresponding author: Anja Krieger-Liszkay, e-mail: anja.krieger-liszkay@cea.fr, phone: 00 33 (0)1 69 08 18 03

Abstract

AIR12 and NQR are two proteins attached to the plant plasma membrane which may be important for generating and controlling levels of reactive oxygen species in the apoplast. AIR12 (Auxin Induced in Root culture) is a single gene of Arabidopsis that codes for a monoheme cytochrome b. The NADPH quinone oxidoreductase NQR is a two electron-transferring flavoenzyme that contributes to the generation of $O_2^{\cdot-}$ in isolated plasma membranes. Knockout plants of both NQR and AIR12 generated more $O_2^{\cdot-}$ and germinated faster than the wild-type. Biochemical analysis showed that purified plasma membrane from soybean hypocotyls or roots contained phyloquinone and menaquinone-4 as redox carrier. This is the first report on the occurrence of menaquinone-4 in eukaryotic photosynthetic organisms. Electron donation from semi-reduced menadione to purified recombinant AIR12 was shown to take place. NADH-dependent $O_2^{\cdot-}$ production at the plasma membrane in the presence of NQR was reduced upon addition of AIR12. We propose that NQR and AIR12 interact via the quinone, allow an electron transfer from cytosolic NAD(P)H to apoplastic monodehydroascorbate and control thereby the level of reactive oxygen production and the redox state of the apoplast.

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are known to play an important role in plant development, in the defense against pathogens and in signaling of environmental changes (Wrzacek *et al.*, 2013; Richards *et al.*, 2015; Dietz *et al.*, 2016; Oracz and Karpinski, 2016). Superoxide anion radicals, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals have been shown to be implicated in extension growth and in seed germination (Fry *et al.*, 1998; Schopfer *et al.*, 2002). Following imbibition of seeds, extracellular hydroxyl radicals loosen the cell wall by catalyzing scission of polysaccharides (Fry *et al.*, 1998; Schopfer *et al.*, 2002, Müller *et al.*, 2009). ROS are generated inside the cell by electron transfer reactions in chloroplasts and mitochondria, by metabolic reactions in peroxisomes and by specialized enzymes like for example xanthine oxidase. The most important site of ROS generation involved in developmental processes is the plasma membrane.

The plant plasma membrane is the barrier between apoplast and symplast and it plays a highly important role in the response to stresses, is responsible for signal transduction, for nutrient uptake and cell wall related processes. At the level of the plasma membrane ROS are

generated by several enzymes. The plasma membrane contains a complex redox system (for a recent review see Lühtje *et al.* 2013). Amongst other redox proteins, several types of cytochrome b have been identified such as the Cytb561 family, flavocytochromes b and AIR12, an ascorbate-reducible cytochrome b. As mobile electron carriers, quinones are likely to be present in the plasma membrane. A quinone with vitamin-K-like characteristics has been identified in plasma membranes isolated from maize roots (Lühtje *et al.*, 1998). NAD(P)H-dependent flavoproteins (NQRs) with a quinone reductase activity have been isolated from plasma membrane preparations of several plant species (Trost *et al.*, 1995; Bérczi *et al.*, 1998; Schopfer *et al.*, 2008). QRs are generally supposed to act as antioxidant enzymes by keeping membrane prenylquinones in the reduced state (e.g. Beyer *et al.*, 1998). Oxidized quinones can be potentially reduced by a number of enzymes to their semiquinones that may subsequently react with O₂ generating O₂^{•-}. However, beside their anti-oxidant function, QRs can also act in a pro-oxidant manner depending on the midpoint potential and the stability of the deprotonated form of the quinols. Schopfer *et al.*, (2008) reported NQR-dependent superoxide anion radical generation at slightly alkaline pH values. In this reaction NQR catalyzes the reduction of menadione (vitamin K3). In an alkaline solution, the hydroquinone becomes deprotonated and generates semiquinone and subsequently superoxide in an autocatalytic reaction with oxygen.

The flavocytochromes b, also called the respiratory burst oxidase homologues RBOHs or NOXs (NADPH oxidases), have been shown to be implicated in the generation of ROS needed to initiate germination (Müller *et al.*, 2009). Inhibitor studies on isolated plasma membranes point to the implication of not only NADPH oxidases but also NQR in O₂^{•-} production at the level of the membrane (Heyno *et al.*, 2011).

Both, AIR12 and NQR have been found to be involved in the interaction of plants with necrotrophic pathogens. Leaves of the NQR knockout mutant showed fewer lesions, higher conidial germination and higher ROS production when infected with *Botrytis cinerea* (Heyno *et al.*, 2013). AIR12 knockout plants were found to be less susceptible to *B. cinerea* infections while they were reported to contain higher levels of H₂O₂ and to generate more hydroxyl radicals compared to the wild-type (Costa *et al.*, 2015). These observations indicate that both enzymes, (AIR12 and NQR) are important for controlling the redox status of the apoplast via controlling the level of ROS generation.

AIR12 has been described as an ascorbate-reducible cytochrome b anchored to the apoplastic side of the plasma membrane by glycosylphosphatidylinositol (Preger *et al.*, 2009). The coding gene *air12* (for auxin induced in root cultures) is early expressed during auxin-induced lateral root formation in *Arabidopsis* (Laskowski *et al.*, 2002). It has been shown recently that an *air12* mutant line shows higher germination rate and reduced growth of lateral roots under abiotic stresses (Gibson and Todd, 2015). NQR is likely to be associated to the cytoplasmic side of the plasma membrane (for review see Berczi and Möller, 2000).

Both AIR12 and NQR may play a role as either anti-oxidant or pro-oxidant enzymes depending on the redox status of the plasma membrane and the apoplast. It has been shown previously that NQR catalyzes the reduction of menadione (2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K3) to menahydroquinone that generates superoxide via the formation of the semiquinone at pH values ≥ 6.5 (Schopfer *et al.*, 2008). However, quinone reductases (QRs) are generally thought to play an antioxidant role by keeping quinones in the reduced state and thereby preventing the production of semiquinones by other enzymes (Trost *et al.*, 1995; Beyer *et al.*, 1996; Radjendriane *et al.*, 1998). Semiquinones are a potential source of $O_2^{\cdot-}$. AIR12 has been shown to be reduced by ascorbate or $O_2^{\cdot-}$ (Costa *et al.*, 2015). Reduced AIR12 reacts with oxygen and reduces it most likely to $O_2^{\cdot-}$ since it performs one electron reactions. Therefore this enzyme can play an antioxidant role in its oxidized state and a pro-oxidant role in its reduced state.

Here we address the question whether an electron transfer across the plasma membrane from cytosolic NAD(P)H via NQR, phyloquinone and AIR12 can take place and whether it plays a role in controlling ROS levels at the plasma membrane and in the apoplast. To show the importance of NQR and AIR12 in developmental processes, germination of T-DNA insertion mutants *nqr*, *air12* and the double mutant *nqrair12* was investigated. $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 production and the activity of the antioxidant enzymes SOD, catalase and peroxidases were measured in these mutants. Furthermore the quinone content of the plasma membranes was determined by HPLC. To test the hypothesis whether an electron transfer from NAD(P)H via NQR, quinone to AIR12 may take place, the midpoint potential of the Flavin cofactor of NQR was determined and the oxidation of a naphthoquinol by AIR12 was followed. It is proposed that the redox couple NQR/quinone/AIR12 is involved in controlling ROS levels at the level of the plasma membrane.

Materials and Methods

Plants and Growth Condition

Arabidopsis thaliana ecotype Landsberg erecta (Ler-0) ecotype were used in this study. T-DNA insertion KO lines for *nqr* (At3g27890) and *air12* (At3g07390) were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) and the CSHL collection (ET8602), respectively. The double mutant *nqrair12* was obtained by crossing the single homozygous lines. The presence of the insertions was confirmed by PCR-based genotyping and a homozygous line was selected and named *nqrair12*.

Plants were grown in a growth chamber in a 16 h light regime (light intensity: 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). During the light period the temperature was set to 22°C and to 18°C during the dark period. After two months, plants were transferred to 23°C under continuous light for two weeks of desiccation. Freshly harvested seeds were stored at -20°C. Three different cultures have been done and for each culture the seeds of 16 plants were weighted and then pooled to obtain a stock of seeds for each biological replicate. 1000 dry seeds of the three replicates have been weighted. For the average of rosette mass, the plants were harvested before the development of the first flower, 3 weeks after sowing. 30 plants were weighted for each of the three biological replicates.

Seedlings of soybean (*Glycine max* 'Jurto') were grown on wet vermiculite in darkness for 4.5 days at 25°C. Plasma membranes were prepared from soybean roots and from the top one cm of the hypocotyl (growing zone) according to Heyno et al. (2011).

Germination tests

Two technical replicates of about 100 seeds each have been done for the 3 biological replicates. The seeds were germinated on filter paper saturated with water in square plastic dishes placed vertically. After 3 days of stratification in a cold chamber at 6°C in darkness, the seeds were placed in a growth chamber at 15°C under continuous light (120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). The germination was scored twice a day under a binocular microscope and was complete after 4 days. A seed was considered as germinated as soon as the radicle protruded through the envelope.

Measurements of ROS production

For each measurement (2 technical replicates of each of the 3 biological replicates) 20 mg of seeds were stratified and imbibed in the same conditions as for the germination test (3 days at 6°C and then transferred to 15°C under continuous light). After 48 hours of imbibition, the seeds were collected and incubated for an hour in the assay solution (500 µL) on a shaker at 25°C in darkness as described by Schopfer *et al.*, 2001. The blanks were done without seeds and were used to correct for unspecific changes.

For the determination of superoxide, the assay contained 10 mM phosphate buffer pH 6.0 and 500 µM Na, 30-1- [phenylamino- carbonyl] -3, 4-tetrazolium-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate (XTT, Sigma-Aldrich). XTT reduction was measured at 470 nm ($\epsilon_{470} = 24.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). For the determination of hydrogen peroxide, the assay contained 10 mM phosphate buffer pH 6.0, 3 µg ml⁻¹ horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) and 5 µM scopoletin (Sigma-Aldrich). The fluorescence was measured (excitation: 346 nm, emission: 455 nm) and the H₂O₂ concentration was quantified using a calibration curve obtained with known H₂O₂ concentrations.

Phylloquinone determination

Phylloquinone was determined by the method of van Oostende *et al.* (2008) with the following modifications: the zinc post-column was 1 × 0.4 cm, and the solvent was methanol containing 10 mM ZnCl₂, 5 mM sodium acetate and 5 mM acetic acid. The flow rate was 1 ml/min. The fluorescence detection was performed at 245 nm excitation and 430 nm emission (Kruk *et al.*, 1994). Vitamin K1 and menaquinone-4 standards were obtained from Sigma-Aldrich and Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland), respectively.

Purified proteins

Recombinant proteins of NQR and AIR12 were produced and purified according to Sparla *et al.* (1999) and Preger *et al.* (2009), respectively. The purified proteins were stored at -80°C. The protein content of plasma membrane preparations was determined with the Bradford assay.

Table I. Weight of seeds and plants of wild-type, *nqr*, *air12* and *nqrair12*. The average values from three biological replicates are presented for each parameter measured with standard error (mean \pm SE; n = 15 for seeds mass per plant and n = 30 for rosette weight of 4 weeks old plants). The * and ** indicate significant differences between mutants and wild-type (*:P < 0.05 and **:P < 0.1).

genotype	Average seeds masse per plant (mg \pm SE)	Average rosette weight (mg \pm SE)	1000 seeds weight (mg \pm SE)
WT	70.1 \pm 3.3	90.0 \pm 3.9	15.1 \pm 0.3
<i>nqr</i>	89.1 \pm 5.2 *	107.8 \pm 5.8 *	15.8 \pm 0.6
<i>air12</i>	94.0 \pm 4.0 *	106.0 \pm 5.4 *	15.1 \pm 0.3
<i>nqrair12</i>	64.0 \pm 2.8 *	102.5 \pm 4.6 **	15.6 \pm 0.5

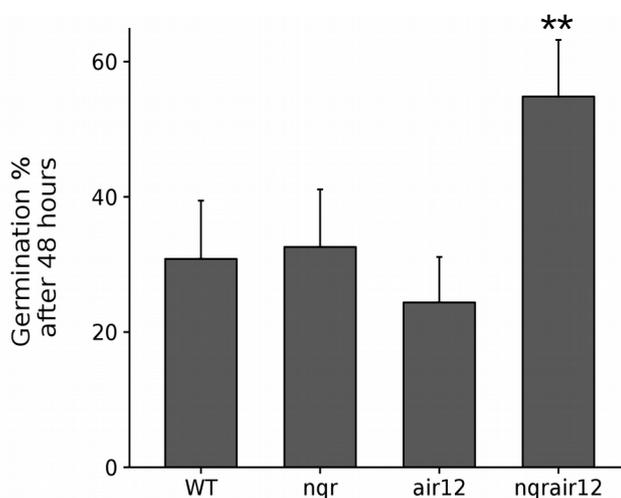


Figure 1 : Seed germination of wild-type, *nqr*, *air12* and *nqrair12* after 48 hours of imbibition at 15°C in continuous light (mean \pm SE). The average values from three biological replicates and three technical replicates are presented with standard error (mean \pm SE; n = 100). The ** indicate significant differences between mutants and wild-type (P < 0.1).

Oxidation kinetics of MDH₂ by AIR12

Absorbance changes were followed using a diode array spectrometer (Specord S600, Analytik Jena, Germany). The assay contained 200 μ M MDH₂, and 20 mM MES at pH 6.55 or 5.8 and 38.5 nM AIR12 when indicated.

Redox titration of NQR

Electrochemical titrations of the absorption spectrum of NQR were performed at room temperature under N₂ atmosphere in a 2.5 ml quartz cuvette. The protein sample was diluted to 110 μ M in 30 mM Hepes 100 mM KCl pH 7.5 buffer and mixed with the following redox mediators (final concentration of 1 - 2 μ M) of menadione ($E_{m,7}$ = 0 mV), 2,5- dihydroxy-p-benzoquinone ($E_{m,7}$ = -60 mV), anthraquinone ($E_{m,7}$ = -100 mV), indigo carmine ($E_{m,7}$ = -125 mV), Anthraquinone-1,5-disulfonate ($E_{m,7}$ = -170 mV), Anthraquinone-2-sulfonate ($E_{m,7}$ = -225 mV), phenosafranine ($E_{m,7}$ = -252 mV), safranine T ($E_{m,7}$ = -289 mV), benzylviologen ($E_{m,7}$ = -350 mV), methylviologen ($E_{m,7}$ = -440 mV). Absorption spectra were recorded with a UV-visible spectrophotometer (Uvikon XL, Secomam) and the potentials were measured with a potentiostat (Electrochemical Analyser, CH Instruments Inc., Switzerland) using a silver/silver chloride reference electrode (Dri-Ref 2, World Precision Instruments, USA) saturated with 3 M KCl. The working electrode was a gold grid and the auxiliary electrode a platinum wire.

Results

Characterization of *nqr*, *air 12* and the *nqrair12*

The phenotype of *Arabidopsis thaliana* ecotype Landsberg erecta T-DNA insertion mutants *nqr* and *air 12* and the double mutant *nqrair12* was analyzed. Under normal growth conditions, these mutants did not exhibit any major phenotype. The mutants showed slightly higher weight when grown at 16 h light 22°C/8 h dark 18°C, and the single mutants produced about 15% more seeds per plant with a similar seed weight as the wild-type (table 1). However, under stress conditions a clear phenotype became visible for the double mutant. As shown in Figure 1, seeds of the double mutant *nqrair12* germinated in continuous light at 15°C significantly faster than the wild-type and the single mutants while no difference was observed when the germination was studied at 20°C instead of 15°C (not shown).

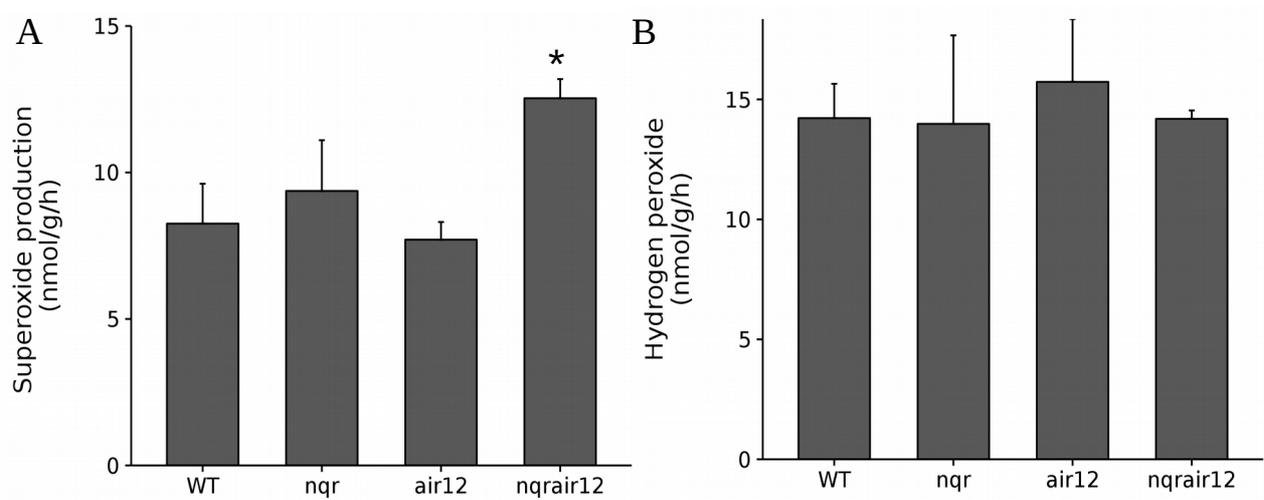


Figure 2. Superoxide (A) and hydrogen peroxide (B) production by seeds imbibed 48 hours at 15°C in continuous light (mean \pm SE). The average values from three biological replicates and three technical replicates are presented with standard error (mean \pm SE; n= 6). The * indicate significant differences between mutants and WT (P < 0.05).

Since it is well established that a certain level of reactive oxygen species is beneficial for germination (Bailly *et al.*, 2008), we tested whether the faster germination in the double mutant correlated with an increase in ROS. As shown in Figure 2, superoxide anion radical production was increased in imbibed seeds of the double mutant compared to the other genotypes while H₂O₂ production was similar in all genotypes. The discrepancy between O₂^{•-} and H₂O₂ production may be either caused by differences in the amount of the antioxidant enzymes or may indeed be due to total higher production rate of O₂^{•-}. The SOD activity was lower in the double mutant while the catalase activity was increased in all mutants compared to the wild-type (Fig. 3A,B). The data presented here do not allow to distinguish whether the higher O₂^{•-} production in *nqrair12* is caused by a higher rate of superoxide production or by a lower SOD activity. Since O₂^{•-} is a precursor of H₂O₂, the increase in catalase activity may explain why no difference in H₂O₂ production was found between genotypes. Peroxidase activity measured as the oxidation of guaiacol was lowered in *air12* and in *nqrair12* compared to the wild-type and *nqr* (Fig. 3C).

Biochemical characterization of the prenylquinones in the plasma membrane, AIR12 and NQR

The question arises whether AIR12 and NQR have an anti-oxidant or a pro-oxidant role and whether the two enzymes operate together in controlling ROS levels at the plasma membrane. To study this question we investigated which quinones are present in the plasma membrane as potential substrates for AIR12 and NQR. Lühtje *et al.* (1998) have reported the presence of phyloquinone in plasma membranes isolated from primary maize roots. The content of the phyloquinone has not been quantified previously. HPLC analysis of plasma membrane extracts from hypocotyls from 4 days old dark-grown soybean seedlings is shown in Fig. 4. According to the HPLC analysis of the extracts and prenyllipid standards, it was found that the plasma membrane contains menaquinone-4 (vitamin K2) and phyloquinone (2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K1). The concentration of the quinones was 1.89 ± 0.05 ng vit. K1/mg protein and 7.69 ± 0.70 ng vit. K2/mg protein in plasma membranes from hypocotyls (SE, n=3). Plasma membranes from roots contained 0.52 ± 0.04 ng vit. K1/mg protein and 6.40 ± 0.96 ng vit. K2/mg protein (SE, n=3)). No other prenylquinones were found in the plasma membrane preparations showing that these membranes were not contaminated by mitochondria or plastids.

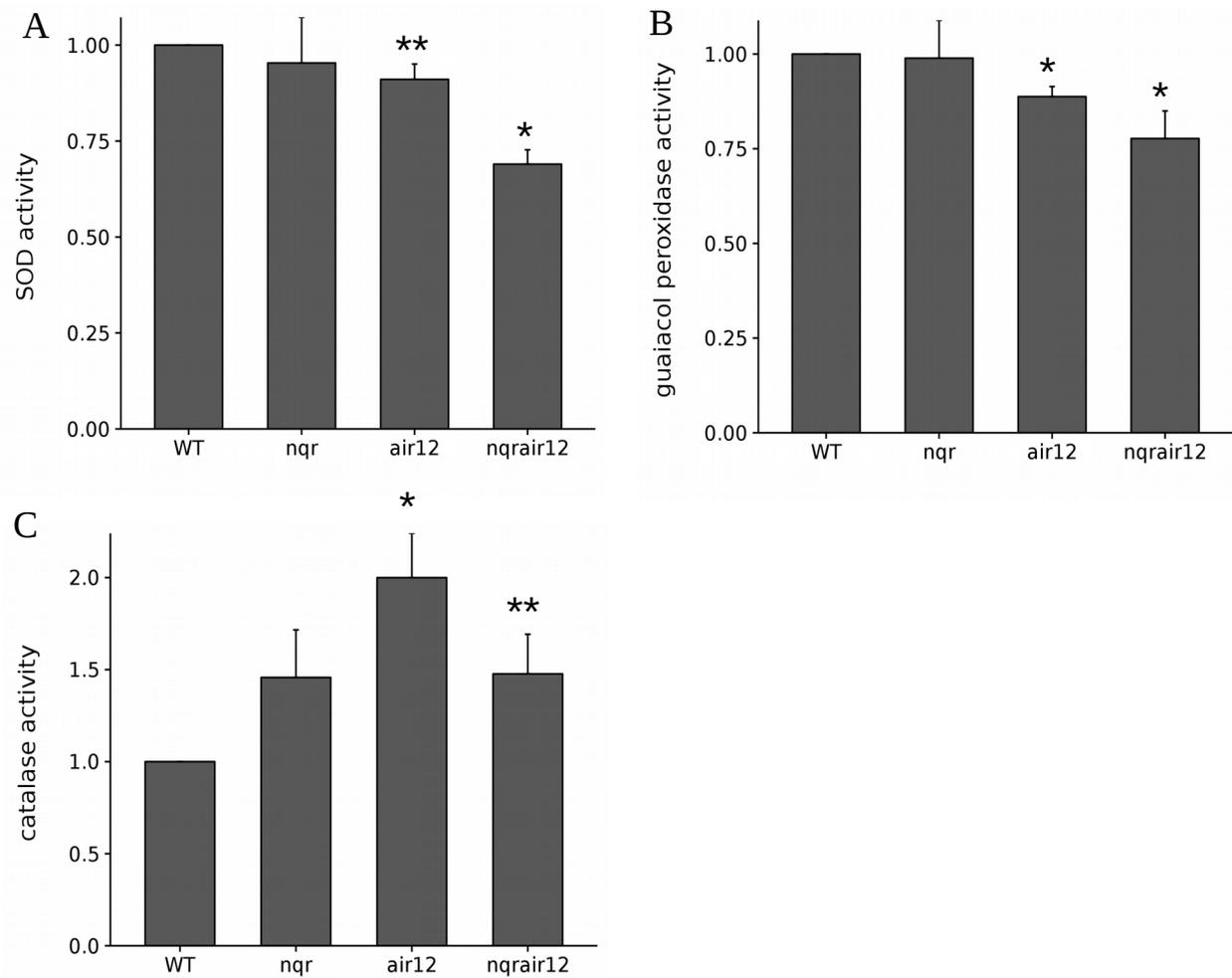


Figure 3. ROS antioxidant enzyme activities of total soluble protein extracts from 4 days old plantlets grown under continuous light at 15°C.

(A) catalase activity, (B) superoxide dismutase activity; (C) Guaiacol peroxidase activity.

All activities(mean \pm SE) were normalized to the corresponding wild-type of each of the three repetitions. The catalase activity corresponded to $13.1 \pm 1.3 \text{ nmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$; the SOD activity corresponded to $1.05 \pm 0.26 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$; $12.0 \pm 2.7 \text{ } \mu\text{mol tetraguaiacol s}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$. The * and ** indicate significant differences between mutants and WT (P < 0.05 and P < 0.1, respectively).

Next we characterized the enzymatic activity of AIR12 to show whether this enzyme is able to oxidize menadiol (MDH₂) or the semiquinone and reduces thereby the superoxide production at the level of the plasma membrane. Fig. 5 shows the autoxidation of MDH₂ and the acceleration of the MDH₂ oxidation by AIR12 at pH 6.55. When the same measurements were performed at a pH 5.8 instead of pH 6.55, MDH₂ was much more stable independent of the presence AIR12. Thus AIR12 is not able to oxidize MDH₂. This shows that the semiquinone that is formed at pH \geq 6.5 and not MDH₂ serves as substrate of AIR12.

In the following we address the question if a putative electron transport across the plasma membrane could take place involving the enzymes NQR, AIR12 and vitamin K as electron carriers. It has been reported previously that AIR12 contains as redox active cofactor a high potential cytochrome b which shows two apparent midpoint potentials with $E_{m,7} = 137$ mV and 236 mV (Preger *et al.*, 2009). The midpoint potential of phylloquinone is -43 mV according to Riegel *et al.* (1940). The midpoint potential of NQR was determined by performing a potentiometric redox titration following the changes in the absorption at 450 nm (Fig. 6A). Recombinant purified NQR (Sparla *et al.*, 1999) was used which contained about 70% FMN (see suppl. Material). The sample was first reduced and titrated towards more positive potentials. Although a combination of redox mediators was applied, the complete titration was very slow (up to 8 h). Only oxidative titrations were performed because too long titrations (more than 8 h) led to precipitation of the sample as seen by the appearance of turbidity in the sample. Taking either the absorption maximum of the sample at 450 nm or the shoulder at 475 nm the points were best fitted with a Nernst curve with a two electron transition and a midpoint potential $E_{m,7.5} = -209$ mV. This value is close to the published values for free FMN $E_{m,7} = -207$ mV at pH 7.0 (Mayhey, 1999). The absorption spectra before starting the titration and at the end of the titration were identical, therefore we can exclude the possibility that FMN was lost from the protein during the titration (Fig. 5B). About 10% of the maximum absorbance was lost due to the precipitation of a small amount of protein.

Isolated plasma membranes generate O₂⁻ in the presence of NADH and NQR at pH values higher than 6.5. When AIR12 was added the O₂⁻ production was lowered (Table 2). Since NQR reduces vitamin K to its quinol and AIR12 oxidizes both the semiquinone and O₂⁻, the two enzymes together prevent superoxide production originating from the semiquinone state of vitamin K.

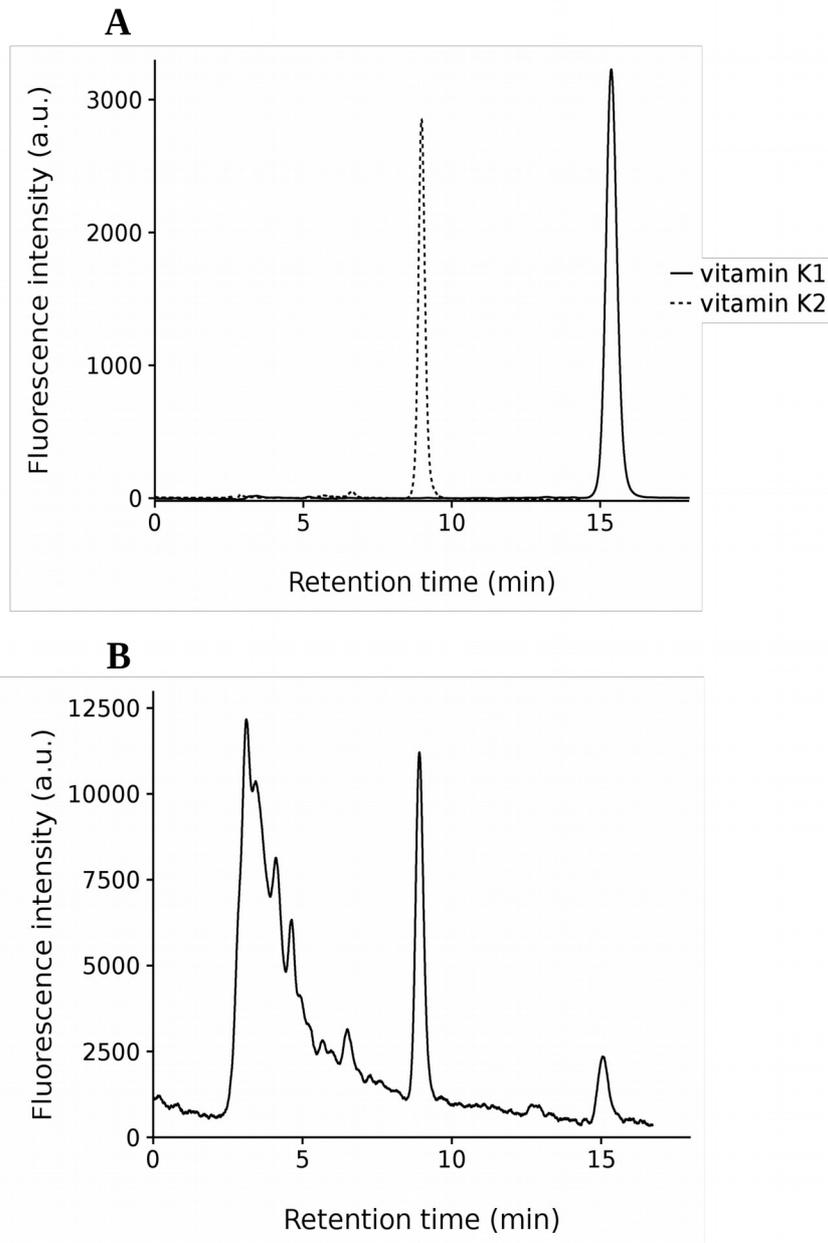


Figure 4. HPLC identification of phylloquinone (vitamin K1) and menaquinone-4 extracted from isolated plasma membrane of soybean hypocotyls. (A) elution profile of the standards vitamin K1 and vitamin K2, (B) elution profile of hypocotyls extracts from isolated plasma membranes.

Discussion

Electron transport reactions at the level of the plant plasma membrane have been studied for a long time, but still the activity and cooperation between previously identified enzymes remains largely unknown (for review see Lühtje *et al.*, 2013) The present study provides evidence for a putative transmembrane plasma membrane electron transport chain from NAD(P)H to AIR12, involving NQR, phyloquinone and/or menaquinone-4.

Phylloquinone and menaquinone-4 (MK-4) were found to be present in plasma membranes isolated from hypocotyls and roots of soybean seedlings (Fig. 4). The concentrations of the quinones seem to be very low when based on protein content. However, given the restricted volume of the membrane, the reported values correspond to a reasonably high concentration. Phylloquinone has been shown previously to be present in plasma membranes isolated from maize roots (Lühtje *et al.*, 1998). MK-4, however, has not yet been reported as a constituent of plant membranes (Nowicka and Kruk 2010), and this is the first report on the occurrence of menaquinones in organisms performing oxygenic photosynthesis. It is known that in mammals vitamin K1 can undergo side-chain cleavage to release menadione. Menadione is converted in human cells to MK-4 with geranylgeranyl pyrophosphate by the enzyme UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1 (Nakagawa *et al.*, 2010). In mammals, MK-4 is ubiquitously present in extrahepatic tissues, with particularly high concentrations in the brain, kidney and pancreas. A blast shows that homologue sequences are present in cyanobacteria, green algae and higher plants. In soybean, a non-characterized protein with a sequence identity of 22% and similarity of 40% is found. It seems likely that in plants a homologue of UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1 is responsible for the synthesis of MK-4 in the plasma membrane.

According to the data shown in Fig. 5, in an aqueous solution the semiquinone is efficiently oxidized by AIR12. Inside the plasma membrane the quinol generated by oxidation of NAD(P)H catalyzed by NQR has to get deprotonated before it is able to react with O_2 yielding $O_2^{\cdot-}$ and the semiquinone. In aqueous solution at pH values ≥ 6.5 menadiol becomes deprotonated and in the presence of oxygen $O_2^{\cdot-}$ and the semiquinone are formed (Schopfer *et al.*, 2008). The pH in the cytoplasm was determined to be 7.3 in *Rumex* and *Pelargonium* leaves (Savchenko *et al.*, 2000) and the pH in the apoplast varies largely depending on the species and the developmental state of the tissue and the used method. For example values between pH 6.1 in potatoe leaves (Oja *et al.*, 1999) and pH 4.8 in *Phaseolus vulgaris*

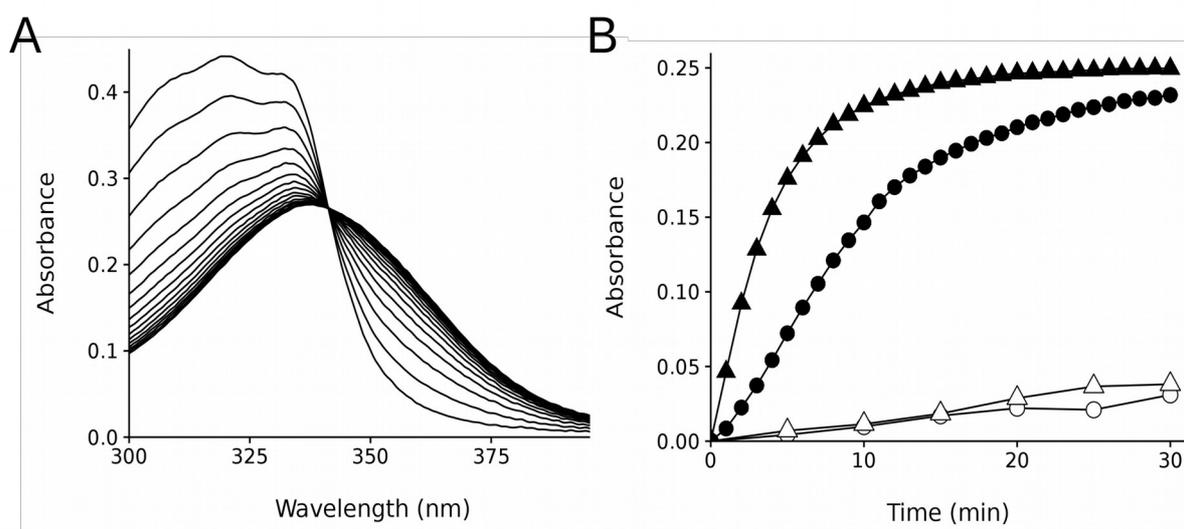


Figure 5. Effect of AIR12 on the oxidation kinetics of MDH₂. (A) Spectra were recorded at pH 6.55 every min in the presence of AIR12. B shows the time course of the absorption changes at 320 nm at pH 6.55 in the absence of AIR12 (closed circles), in the presence of AIR12 (closed triangles) and at pH 5.8 in the absence of AIR12 (open circles) and in the presence of AIR12 (open triangles). The samples contained 200 μ M MDH₂ and 40 nM AIR12.

Table 2. Plasma membrane superoxide production activities with NQR and AIR12 at pH 7.5.

Assay contained 50 μ g plasma membranes (Pm) from soybean hypocotyl, 10 nM NQR, 10 nM AIR12 when indicated, 200 μ M NADH, 500 μ M XTT and 20 mM Hepes pH 7.5. The different letters indicate significant differences at the $p = 0.05$ level.

assay	XTT reduction (nmol/mg/min)
Pm + NQR	95 \pm 3 a
Pm + NQR + AIR12	80 \pm 2 b

(O’Leary *et al.*, 2016) have been reported in the literature. No pH is defined inside a membrane, but the deprotonation of the quinol is likely to take place since NQR-dependent $O_2^{\cdot-}$ generation is observed using isolated plasma membranes. Superoxide production by plasma membranes can partly be attributed to NQR activity beside the well-known $O_2^{\cdot-}$ generating activity of NADPH oxidases (RBOHs) (Heyno *et al.*, 2011). In the aqueous system the semiquinone is efficiently oxidized by AIR12 (Fig. 5). It has been shown that AIR12 is reduced, beside by the semiquinone as shown here, by $O_2^{\cdot-}$ and by ascorbate (Preger *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015). Reduced AIR12 is oxidized rapidly by monodihydroascorbate while autoxidation of the cytochrome is slow (Costa *et al.*, 2015). We propose that an electron transport between NQR, phyloquinone and AIR12 is potentially important in controlling ROS levels in the apoplast (Fig.7). Transmembrane electron transport involving cytosolic NAD(P)H has been shown before using NAD(P)H-loaded membrane vesicles and artificial electron acceptors such as 2,6-dichlorophenolindophenol-3'-sulfonate, ferric citrate or ferricyanide (Askerlund and Larsson, 1991; Menckhoff and Lühtje, 2004). However the protein partners responsible from cytosolic NADPH to the apoplastic side of the membrane had not been identified previously.

The redox couple NQR/AIR12 seems to play an important role in controlling ROS levels under certain physiological conditions. As shown in Fig. 1, the double mutant *nqrair12* germinated faster at non-optimal temperatures than the single mutants and the wild-type. For developmental processes it has been proposed that a certain “oxidative window” is favorable. In the mutants affected in NQR, in AIR12 and especially in the double mutant the ROS levels are shifted more to the higher boarder of this window allowing faster germination under less favorable conditions (15°C in continuous light) and resulting in higher mass and seed production in the single mutants (Table 1). In these mutants the plants don’t have to invest into the synthesis of these proteins and perform their life cycle with slightly higher ROS levels. This seems to be an advantage under control conditions in the greenhouse (about 15% more biomass and seeds) while this may be a disadvantage under field conditions when plants have to face abiotic and biotic stress conditions.

Mutants affected in either AIR12 or NQR have been investigated previously. Gilson and Todd (2015) reported that *air12* seeds germinated faster than the wildtype. This is in contrast to our observation. As shown in Fig. 1 the double mutant *nqrair12* germinated significantly faster at 15°C while the single mutants germinated with the same rate as the

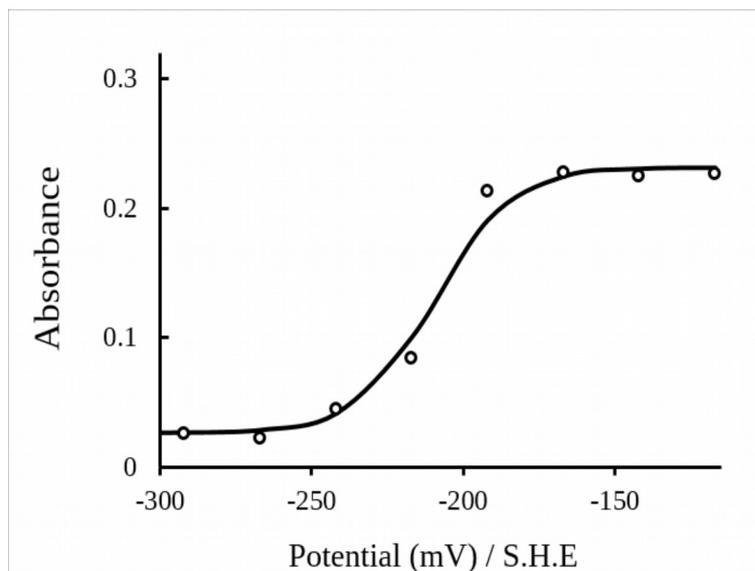


Figure 6A: Redox titration of recombinant NQR at pH 7.5. Absorbance measurements were performed at 450 nm. The points are the experimental measures and the solid line is theoretical titration curve for a two-electrons reaction according to the Nernst equation.

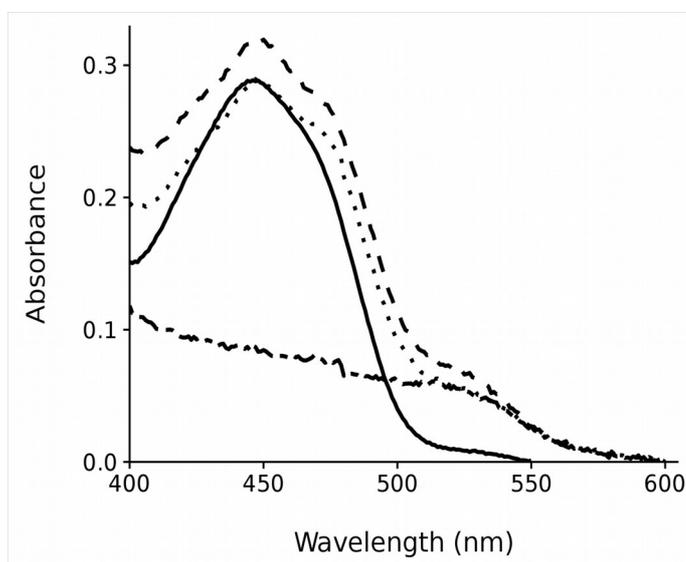


Figure 6B : Absorbance spectra of free FMN and bound to NQR during the redox titration. The solid line is for free FMN, the dashed lines are for oxidized NQR at the beginning of the titration, the dotted-dashed lines are for reduced NQR, the dotted lines are for oxidized NQR at the end of the titration.

wild-type. Our data are consistent with data reported in the literature showing that the *nqr* mutant exhibited no major phenotype under normal growth conditions but that the response to fungal attack was altered (Heyno *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2015). The same knock-out line of *nqr* as used here showed significantly delayed lesions development upon infection with *B. cinerea* while the conidial germination was stimulated (Heyno *et al.*, 2013). Also knockouts of *air12* were less susceptible to *B. cinerea* infection (Costa *et al.*, 2015). In these studies H₂O₂ levels were increased in leaves of *nqr* and *air12* in non-infected leaves, for *air12* the O₂⁻ level was slightly lower in accordance with Gilson and Todd (2013). In the present study a significantly higher O₂⁻ production was observed in imbibed seeds for *nqrair12*, while the single mutants were comparable with the wild-type (Fig. 2 A). In two of the previous studies the activities of the antioxidant enzymes catalase has been measured for protein extracts from rosette leaves from *nqr*, and for *air12* in protein extracts from roots from 13 day old plants. For *nqr* the catalase activity was comparable to the wild-type (Heyno *et al.*, 2013) while it shows in the present study a tendency of being elevated (Fig. 3). The catalase activity was decreased in protein extracts from *air 12* extracted from roots from 13 day plants (Gilson and Todd, 2015) while it is increased in the present study when it was measured in extracts from 4 days old seedlings. In the study by Heyno *et al.* (2013) SOD activity and guaiacol peroxidase activity were unchanged in *nqr* in agreement with the data shown here (Fig. 3 B,C). It seems likely that differences in ROS levels and in the antioxidant activities between the different studies are caused by the developmental stage and by the different growth conditions of the samples used for protein extraction (rosette leaves, roots from 13 days old plants and light/dark period or continuous light).

Taken together, it can be concluded from the mutant studies that both NQR and AIR12 play an important role in controlling ROS production at the plasma membrane. Absence of these proteins increases the ROS levels which stimulated germination, leads to an increase in growth and seed production (table 1) and affects plant-pathogen interactions.

Acknowledgements

We thank Pierre Sétif, I2BC CEA Saclay, for critical reading of the manuscript and Sébastien Thomine, I2BC Gif-sur-Yvette for his help with growing Arabidopsis. This work was supported by ERC.KBBE.2012.1.1-01 (EcoSeed-311840) to C.B. and A. K.-L..

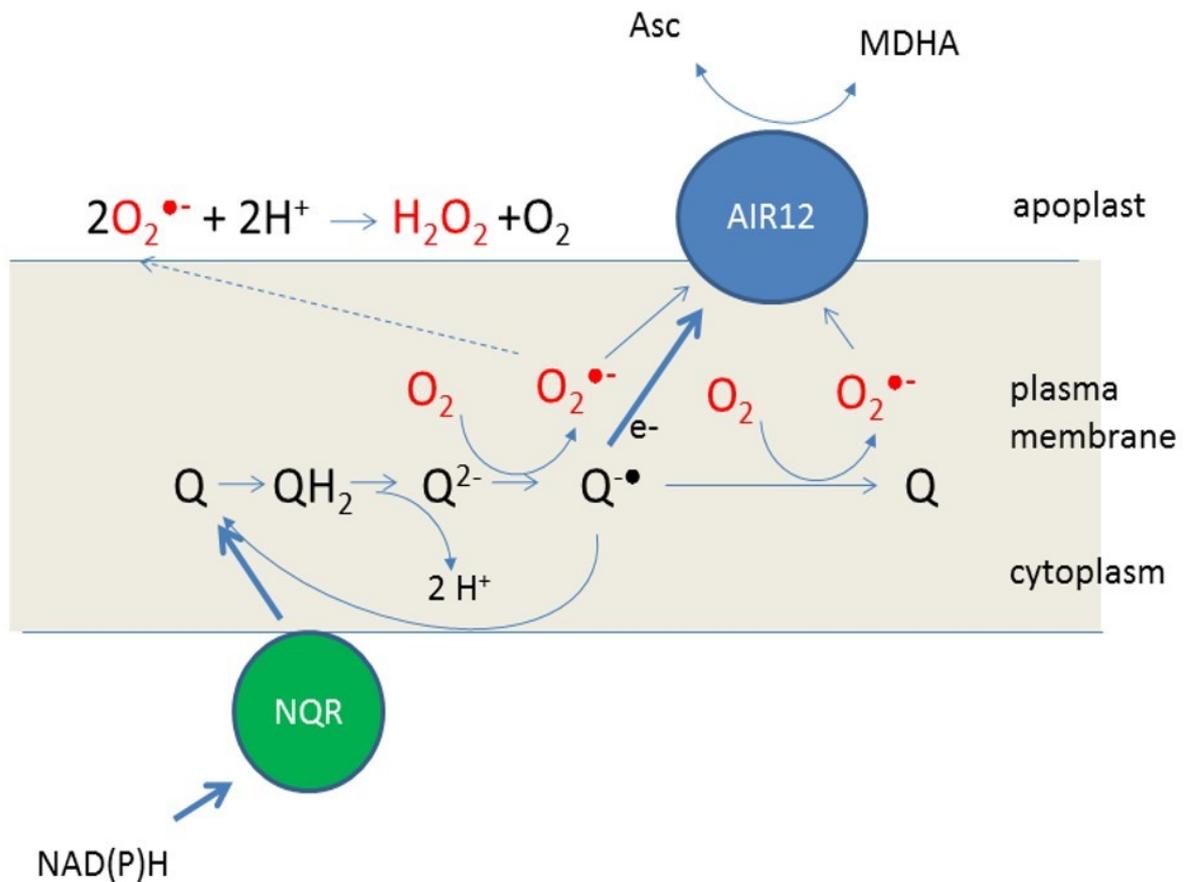


Figure 7. Model of electron transport from cytosolic NAD(P)H to MDHA involving NQR, vitamin K and AIR12. NQR reduces the quinone to the quinol which reacts in its deprotonated form with oxygen generating superoxide and the semiquinone. The semiquinone either donates an electron to AIR12 or to oxygen regenerating the quinone. Superoxide donates an electron to AIR12 or decomposes in the apoplast to peroxide. AIR12 can either reduce MDHA to ascorbate but, depending on its oxidation state it can also act as an ascorbate oxidase.

References

- Askerlund P, Larsson C (1991) Transmembrane electron transport in plasma membrane vesicles loaded with an NADH-generating system or ascorbate. *Plant Physiology* 96,178–1184.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., and Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* 331, 806–814.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014) ROS as key players in ROS stress signaling . *J. Exp. Bot.* 65, 1229-1240.
- Bérczi A, Møller IM (2000) Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles. *Plant Cell Environ* 23, 1287-1302.
- Beyer RE, Segura-Aguilar J, Di Bernardo S, Cavazzoni M, Fato R, Fiorentini D, Galli MC, Setti M, Landi L, Lenaz G. (1996) The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems. *PNAS* 93, 2528.
- Costa A, Barbaro MR, Sicilia F, Preger V, Krieger-Liszkay A, Sparla F, De Lorenzo G, Trost P (2015) AIR12, a b-type cytochrome of the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* is a negative regulator of resistance against *Botrytis cinerea*. *Plant Sci.* 233:32-43
- Dietz KJ, Turkan I, Krieger-Liszkay A (2016) Redox- and Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling into and out of the Photosynthesizing Chloroplast. *Plant Physiol.*171(3):1541-50
- Fry SC (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem J.* 332 (Pt 2):507-15
- Gilson SW, Todd CD (2015) *Arabidopsis* AIR12 influences root development. *Physiol Mol Biol Plants* 21, 479-489
- Heyno E, Mary V, Schopfer P, Krieger-Liszkay A (2011) Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. *Planta* 234(1):35-45
- Heyno E, Alkan N, Fluhr R (2013) A dual role for plant quinone reductases in host-fungus interaction. *Physiol Plant.*149(3):340-53.

- Kruk J, Strzałka K, Schmid GH. 1994. Antioxidant properties of plastoquinol and other biological prenylquinols in liposomes and solution, *Free Radical Research* 21, 409–416.
- Laskowski MJ, Dreher KA, Gehring MA, Abel S, Gensler AL, Sussex IM (2002) FQR1, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase. *Plant Physiol.*128(2):578-90
- Lüthje S, Van Gestelen P, Cordoba-Pedregosa MC, Gonzalez-Reyes JA, Asard H, Villalba JM, Böttger M (1998) Quinones in plant plasma membranes - a missing link? *Protoplasma* (1998) 205:43-51
- Lüthje S, Möller B, Perrineau FC, Wöltje K (2013) Plasma membrane electron pathways and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.*18(16):2163-83
- Mayhew SG (1999) The effects of pH and semiquinone formation on the oxidation–reduction potentials of flavin mononucleotide. *Euro. J. Biochem.* 265, 698-702
- Menckhoff M, Lüthje S (2004) Transmembrane electron transport in sealed and NAD(P)H-loaded right-side-out plasma membrane vesicles isolated from maize (*Zea mays* L.) roots. *J Exp Bot.* 55(401):1343-9.
- Müller K, Linkies A, Vreeburg RA, Fry SC, Krieger-Liszak A, Leubner-Metzger G (2009) In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol.*150(4):1855-65
- Nakagawa K., Hirota Y., Sawada N., Yuge N., Watanabe M., Uchino Y., Okuda N., Shimomura Y., Suhara Y., Okano T. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* 468:117-121(2010)
- Nowicka B, Kruk J. (2010) Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim Biophys Acta.*1797(9):1587-605
- Oja V, Savchenko G, Jakob B, Heber U (1999) pH and buffer capacities of apoplastic and cytoplasmic cell compartments in leaves. *Planta* 209: 239-249
- O'Leary BM, Neale HC, Geilfus CM, Jackson RW, Arnold DL, Preston GM (2016) Early changes in apoplast composition associated with defence and disease in interactions between *Phaseolus vulgaris* and the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* Pv. *phaseolicola*. *Plant Cell Environ.* 2016. doi: 10.1111/pce.12770.

- Oracz K, Karpiński S (2016) Phytohormones Signaling Pathways and ROS Involvement in Seed Germination. *Front Plant Sci.* 7:864. doi: 10.3389/fpls.2016.00864.
- Preger V, Tango N, Marchand C, Lemaire SD, Carbonera D, Di Valentin M, Costa A, Pupillo P, Trost P (2009) Auxin-responsive genes AIR12 code for a new family of plasma membrane b-type cytochromes specific to flowering plants. *Plant Physiol.*150(2):606-20
- Radjendirane V, Joseph P, Lee YH, Kimura S, Klein-Szanto AJ, Gonzalez FJ, Jaiswal AK. (1998) Disruption of the DT diaphorase (NQO1) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *J. Biol. Chem.* 273, 7382
- Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, McAinsh M, Davies JM. The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *J Exp Bot* 2015 Jan;66(1):37-46.
- Riegel, B., Smith, P. & Schweitzer, C. E. (1940) The oxidation-reduction potential of vitamin K. *J. Amer. Chem. Soc.* 62, 992.
- Savchenko G, Wiese C, Neimanis S, Hedrich R, Heber U (2000) pH regulation in apoplastic and cytoplasmic cell compartments of leaves. *Planta* 211: 246-255
- Schopfer P, Liskay A, Bechtold M, Frahy G, Wagner A (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214(6):821-8
- Schopfer P, Heyno E, Drepper F, Krieger-Liskay A (2008) Naphthoquinone-dependent generation of superoxide radicals by quinone reductase isolated from the plasma membrane of soybean. *Plant Physiol.*147(2):864-78
- Sparla F, Tedeschi G, Pupillo P, Trost P (1999) Cloning and heterologous expression of NAD(P)H:quinone reductase of *Arabidopsis thaliana*, a functional homologue of animal DT-diaphorase. *FEBS Lett.*463(3):382-6
- Trost P., Bonora P., Scagliarini S., Pupillo P. (1995) Purification and properties of NAD (P)H: (quinone acceptor) oxidoreductase of sugarbeet cells. *European Journal of Biochemistry* 234, 452–458.
- van Oostende C, Widhalm JR, Basset JC. 2008. Detection and quantification of vitamin K1 quinol in leaf tissues. *Phytochemistry* 69, 2457–2462.

Wrzaczek M, Brosché M, Kangasjärvi J. (2013) ROS signaling loops - production, perception, regulation. *Curr Opin Plant Biol.* 16(5):575-82

Article 2

Dans cet article j'ai préparé les échantillons pour les mesures RPE à haut champ. L'article n'a pas encore été soumis.

***In situ* detection of high concentrations of radicals in seeds by high field electron paramagnetic resonance spectroscopy**

Sun Un*, Catherine Biniek, Anja Krieger-Liszkay
Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), IBITECS, CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France

*Corresponding author: Sun Un, e-mail: sun.un@cea.fr, phone: 00 33 (0)1 69 08 18 03

Summary

- A wide variety of organic radicals can be found in biological samples. Stable organic radicals have been found in seed coat previously but the chemical nature of these radicals has yet not been identified.
- We investigated the presence of organic radicals in seeds of *Arabidopsis thaliana* and a number of other dicotyledonous species by High Field Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy. To identify the chemical nature of the detected radicals Electron Nuclear Double Resonance spectra were measured and Density Functional Theory calculations were performed.
- Seeds contained a large amount of a flavonoid radical that was identified to be (+)-catechin. The radical was formed during seed development and was not detectable in immature white seeds.
- These results show that state of the art electron paramagnetic resonance spectroscopy allows detecting, identifying and characizing radicals in complex biological samples.

Introduction

There exist a wide variety of organic radicals in biological samples. They are generally considered to be highly reactive, often initiators or products of cellular damage. One of the most familiar are radicals generated during lipid peroxidation, a highly damaging chain-reaction process. Yet, some radicals play important roles in catalytic reactions like for example tyrosyl radical formation in photosystem II, or tryptophan radical formation in enzymes like for example photolyase or peroxidases. Relatively stable monolignol radicals are precursors in lignin formation (for review see Barros *et al.*, 2015). Quinone radicals are also generated in the melanin biosynthesis pathway. Reactions of sugar molecules with reactive oxygen intermediates generate radicals during extension growth (Schopfer *et al.*, 2002) and fruit ripening (Fry *et al.*, 2001; Arianah *et al.*, 2016) when cell walls are loosened. These examples show that despite their high reactivity, nature is able control them to carry out essential processes. Stable organic radicals have been found in the seed coat of black pepper and to a lesser extent inside the seed (Nagawana and Epel, 2014) and in the seed coat and endosperm of wheat (Kurdziel *et al.*, 2015). However, the chemical nature of the radicals has not been identified in these publications. Likely candidates are stabilized radical intermediates of monolignoles, the precursors for lignin synthesis, or flavonoid radicals. Both types of radicals are generated by reactions with reactive oxygen species.

One of the challenges of understanding the role of naturally occurring radicals has been simply identifying their chemical identity and structures. This is often even difficult for radicals that are stable. Aside from having an unpaired electron, there is little else to distinguish radicals from other molecules and, yet, most radicals are sufficiently chemically reactive to preclude chemical extraction and mass spectroscopic analysis. It is possible to infer their presence by analyzing for products of known or expected radical reactions, as in the case of lipid peroxidation, and in other cases chemical trapping reagents, such as spin traps, can be used that result in a stable identifiable product (Yin *et al.*, 2011; Hawkins *et al.*, 2009). Such approaches, however, require knowledge or assumptions about the radicals and reactions involved and ignore the role of environmental effects on physico-chemical properties of radicals, in particular their redox properties. This latter issue is particularly important, since work on redox active protein-based radicals has shown that the protein environment often plays a critical role in defining the stability and function of radicals (Stoll *et al.*, 2011; Faller *et al.*, 2003). This work has benefited from the use of Electron

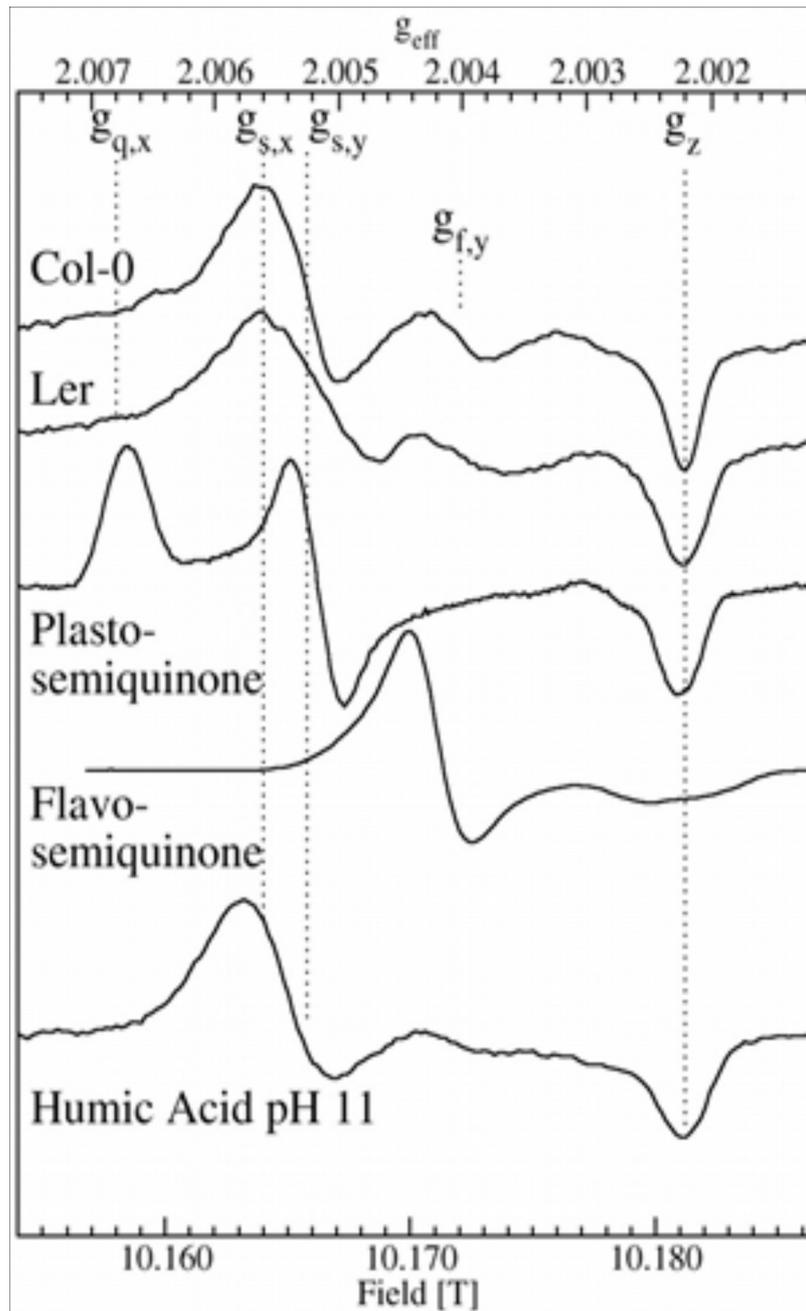


Figure 1. The 4K 285 GHz EPR of dry dicot seeds: Arabidopsis (Col-0 and Ler), of plastoquinone, flavoquinone and of humic acid at pH 11.

paramagnetic resonance (EPR), a technique that can both specifically and with high sensitivity detect radicals. However, conventional EPR has suffered from its lack of ability to resolve different radical species (Hawkins *et al.*, 2009). Typically, 9 GHz microwaves and magnetic-fields around 0.3 T are used to detect radicals in conventional EPR measurements. The use of much higher frequencies and magnetic fields has greatly improved the resolution of the EPR measurements and, hence, its ability to identify radicals. This technique has been used to identify radicals in isolated proteins (e.g. Faller *et al.*, 2003; Ivancich *et al.*, 2011). The extension of HFEPR to *in situ* studies of radicals in organisms has not been explored in any depth (Berthold *et al.*, 1999). Here we demonstrate how we have used HFEPR techniques in conjunction with computational quantum chemistry, in the form of Density Functional Theory (DFT) calculations, to detect, identify and characterize radicals in seeds *in situ*.

Results and Discussion

The 285 GHz HF-EPR of 200 mg of dry *Arabidopsis thaliana* (Ecotypes Col and Ler) seeds show a typical 4K spectrum of an organic radical (Fig. 1). The spectra obtained from the two different ecotypes showed similar features although the intensities of the individual features of the spectra differed. When several seed lots from different mother plants cultivated independently were measured the similar spectra were obtained. The integrated amplitudes were batch dependent, but only by factor two. It was evident from the signal to noise ratio of the HFEPR spectra that there was high concentration of a radical in the seeds. By comparing the HFEPR seed spectra with those of known concentrations of the stable TEMPO radical, we estimated that the minimum radical concentration in the *Arabidopsis* seeds was about 10 μM assuming uniform distribution.

Essentially the same spectrum was also observed for a number of seeds of different dicots (Figure 2). Grains of crops such as rice, wheat and barley had no radicals while onion seeds had a radical, but its HFEPR spectrum was very different from that of the radical found in dicots (data not shown).

The EPR spectrum of a radical is defined by its interaction with the applied magnetic-field, or its Zeeman interaction ($g\mu_B B_0$, $b=13.996246$ GHz/T), and with atoms on and around

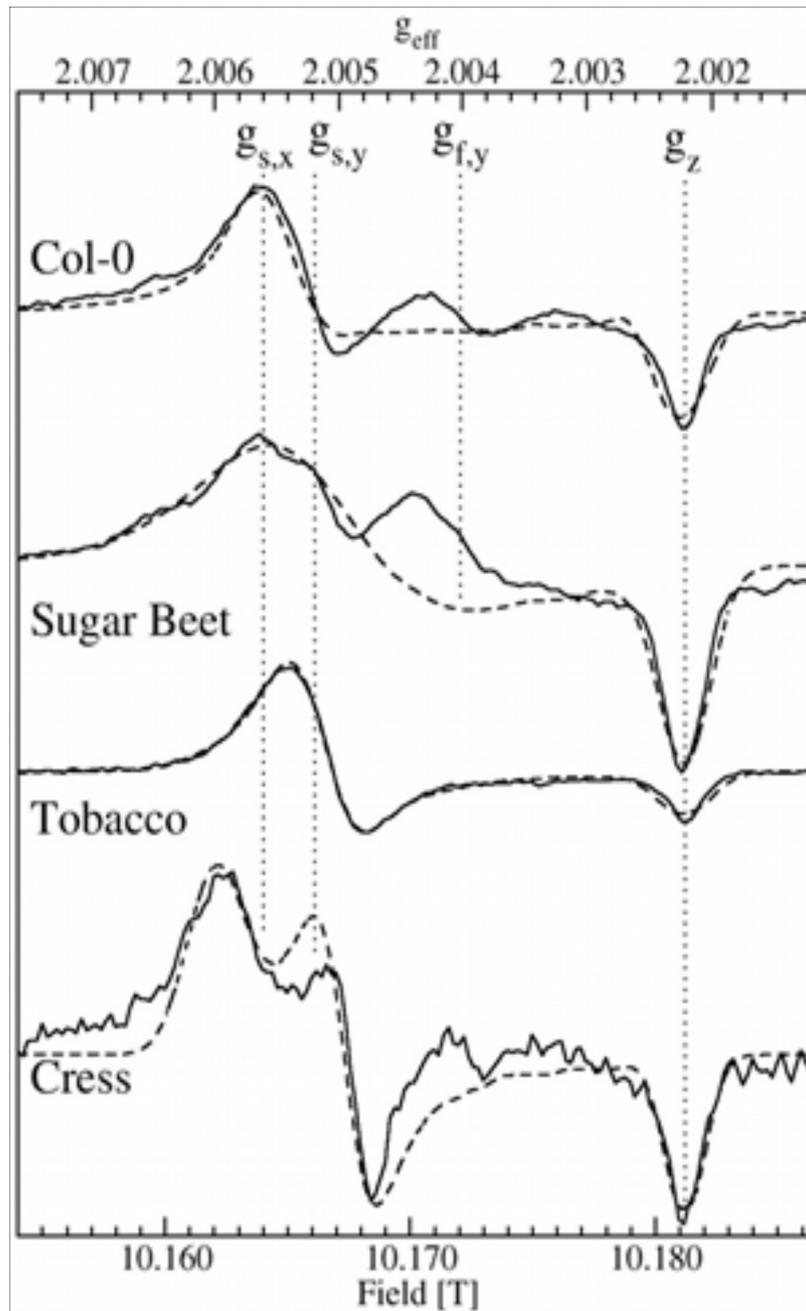


Figure 2. The 4K 285 GHz EPR of dry dicot seeds: Arabidopsis (Col-0 and Ler), sugar beet, tobacco and cress. The dashed traces are best fit the computer simulation.

the radical that have nuclear magnetic moments, for example hydrogens and nitrogens, referred to as hyperfine interactions. The Zeeman interaction of a radical is defined by its three g-values (g_x , g_y and g_z). They are associated with three mutual perpendicular directions within the molecular frame of radical. The size and direction of each of three g-values are dictated by the details of the ground and excited state structures of the radical. As such, the g-values can be used to chemically identify the radical. Their absolute deviation from the g-value of a free electron ($g_e=2.00232$) is small, making them difficult to measure at low conventional magnetic field, but easier at much higher fields (the applied magnetic-field in effect amplifies the differences in g-values). In practical terms, the three g-values of a radical dictates the shape of its HFEPR spectrum: g_x defines the low edge, g_z the high edge and g_y the position of large feature in between (Figure 1). The HFEPR spectrum of radicals can be simulated using standard procedures from which g-values can be obtained. The principle g-values of the *Arabidopsis thaliana* Ler seed radical, for example, were found to be 2.0055, 2.0048 and 2.0022 (labeled $g_{s,x}$, $g_{s,y}$ and g_z in Figure 1 and 2 and Table 1). Most biologically relevant radicals are planar p-conjugated molecules and one property of such radicals is that their g_z lie just below g_e and do not strongly depend on the structure of the radical. As can be seen in Figure 1, this is true of the *Arabidopsis* seed radical, its g_z is identical to those of the *para*-semiquinones and flavosemiquinones. These latter two radicals, as well the seed radical, also have a relative large g_x , a characteristic of planar p-conjugated radicals that have oxygens and nitrogens. The fact the seed g_x is different from the *para*-semiquinones and flavosemiquinones indicates that the seed radical has a significantly different structure. The *Arabidopsis* seed spectra do have an extra feature (at the position labeled $g_{f,y}$) that does coincides with that of the flavosemiquinone suggesting that the seeds have small population of a flavosemiquinone radical. The sensitivity of the g-values is such that the differences in *col-0* and *Ler* eco-types are significant. The g_x and g_y of oxygen and nitrogen bearing organic radicals are also known to be sensitive to their electrostatic interactions with their environments. Hence, it is tempting to assign the differences in the *Col-0* and *Ler* radicals to slightly different environments. The fact that in both eco-types the g_x and g_y features are

Table 1. G-values of seed radicals obtained by simulation. The g values represent the center of a Gaussian distribution with full width of δg_n (n=x,y,z) need to fit the HFEPR spectra.

Radical	g_x	g_y	g_z	δg_x	δg_y	δg_z
<i>col-0</i>	2.0055	2.0053	2.0022	0.0002	0.0011	0.0002
<i>Ler</i>	2.0055	2.0048	2.0022	0.0003	0.0010	0.0001
Sugar Beet	2.0053	2.0052	2.0022	0.0005	0.0012	0.0001
Cress	2.0060	2.0040	2.0022	0.0002	0.0001	0.0001
Tobacco	2.0057	2.0051	2.0022	0.0004	0.0001	0.0001
Humic Acid	2.0056	2.0054	2.0022	0.0001	0.0020	.00001
(+)-catechin powder	2.0057	2.0044	2.0022	0.0003	0.0005	0.0001
(+)-catechin/Mg ²⁺	2.0054	2.0050	2.0022	0.0001	0.0003	0.0001
(+)-catechin	2.0058	2.0055	2.0022	0.0002	0.0002	0.0001
DFT (+)-catechin/Mg	2.0055	2.0048	2.0022			
DFT (+)-catechin	2.0064	2.0062	2.0021			

significantly broader than those of the semiquinones suggested that either the structure of the radical itself was distributed or its interaction with its environment was so. The radical with closest corresponding g-values is the stable humic acid radical at high pH. Humic acids are complex high molecular weight organic substances and radicals are thought to originate from centers that electronically resemble radicals of gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid). Humic and gallic acid radicals like many stable radicals in nature occur through reaction with oxygen or related reactive oxygen species. Lignin radicals are also thought to be centered on 3,4,5-trihydroxyphenyl groups. Alternatively flavonoids may be the origin of the detected radicals. The flavonoid content, especially in the seed coat is very high (Routaboul *et al.*, 2006). Flavonoids have a variety of structures with mono-, di- and trihydroxyphenyl groups that could form stable radicals. It is known that *Arabidopsis* seeds accumulate only flavonols (quercetin-3-O-rhamnoside being a major component) and proanthocyanidins (Lepiniec *et al.*, 2006). The latter is formed by condensation of flavan-3-ols and its oxidation is responsible for browning of the seed coats. Hence it seemed likely to us that the stable seed radical was most likely flavonoid based and, as will be seen, belonging to the flavan-3-ols in particular.

First indication that the radical was flavonoid based was that the HFEPR spectrum of neat commercial available catechin powder sample had a similar spectrum though in this case the signal was very weak (Fig. 3). The HFEPR spectrum of frozen water/DMSO and water/ethanol solutions of the catechin had no signal indicating the radical was not stable (data not shown). Like many quinones, addition of a small amount of base, such as triethylammonia to the catechin solution produced a radical that could be trapped by rapid freezing. Addition of Mg^{2+} to the catechin solution before addition of the base stabilized the radical and thus a higher concentration of the trapped radical was detected. The HFEPR catechin radical spectra of the neat powder and basic solutions with and without Mg^{2+} were all different. The seed and neat powder spectra could be roughly approximated by combining the two types of frozen catechin solution spectra.

What is not discernible in the HFEPR spectra are the hyperfine interactions, the magnetic interactions between unpaired electron spin and the surrounding magnetic nuclei, in particular protons. The number and sizes of these interactions can also help to identify the radical and its structure. Hyperfine interactions, like the g-values, are characterized by their

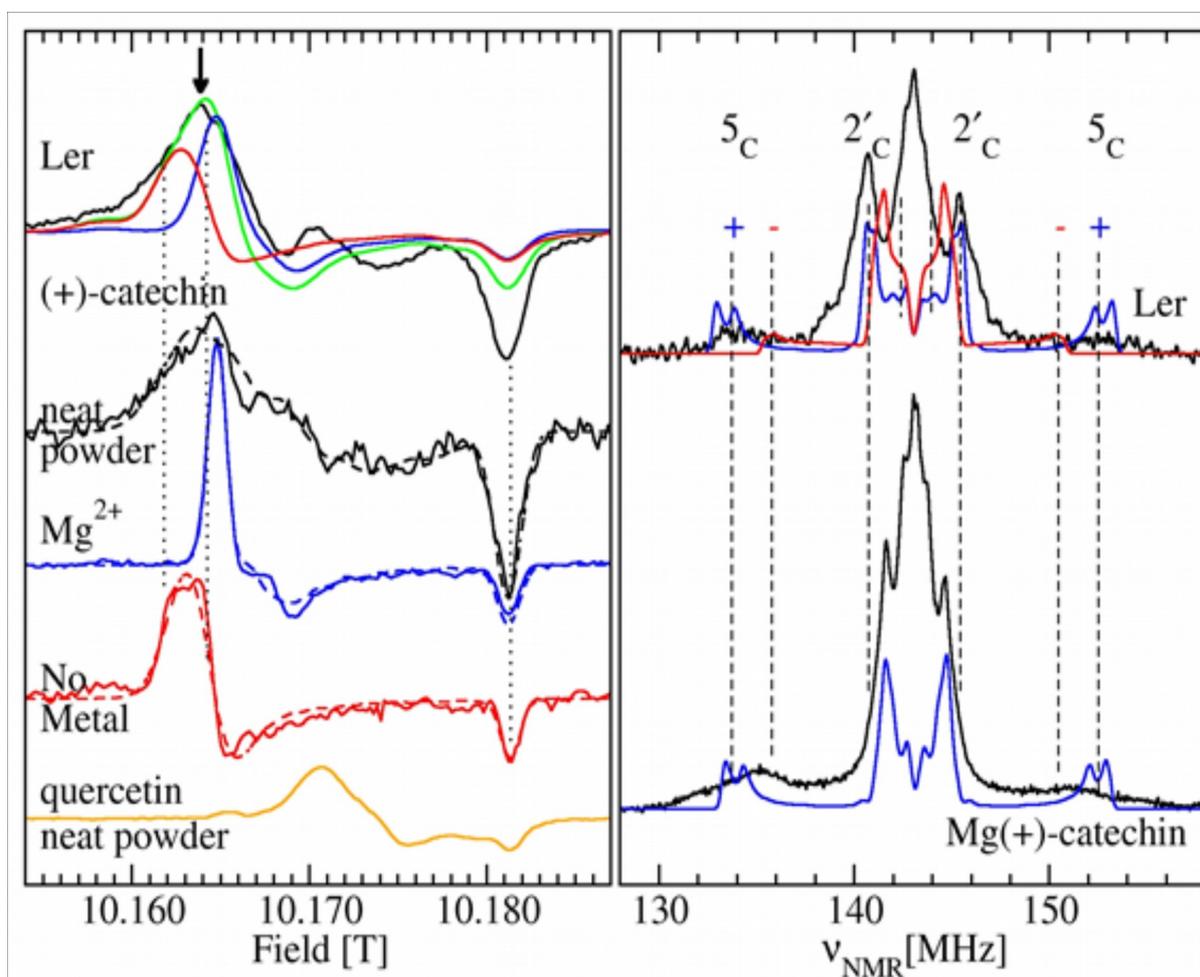


Figure 3. (Left) 285 GHz EPR spectra. The spectra of the chemically generated catechin radicals were numerical broadened and used to decompose the *Ler* seed spectrum (see colour code). The green trace is the total.

(right) 95 GHz ENDOR spectra corresponding to g_y field (arrow in 285 GHz spectra): *Ler* and chemically generated catechin radical in presence of Mg^{2+} . Blue and red traces are calculated spectra based DFT calculations of the models with and without Mg^{2+} ligated to the radical.

three principle values and the directions associated with them. For hydrogen atoms bonded directly to planar p-conjugated systems, the largest value is along X-H bond (where X=N or C). The second value is directed perpendicular to the plane and the third in the mutually perpendicular to the other two. These latter two values, to a rough approximation, are usually equal. The hyperfine interactions can be measured using Electron Nuclear Double Resonances (ENDOR).

In ENDOR spectra of protons, there are two resonances at symmetrically positions at about the proton NMR frequency (143.2 MHz for our spectra). The most prominent features of the seed ENDOR spectrum taken at the field corresponding to g_y indicated by the arrow in Figure 3 were the relatively broad resonances denoted 5_C centered at 134 and 153 MHz and the sharper $2'_C$ resonances at 140.8 and 145.4 MHz corresponding to hyperfine couplings are 19 and 4.6 MHz along g_y direction. The strong peak at the center of the spectrum arises from protons that only weakly interact with the unpaired electron spin, which includes hydrogens atoms on the radical as well as those in the immediate environment including any water molecules. The ENDOR spectrum of the chemical (+)-catechin/ Mg^{2+} radical complex was obtained using a $D_2O/DMSO$ mix to reduce to the contribution from the surrounding water protons to the spectrum that normally made the center of the spectrum very intense. This had the effect of making the ENDOR intensity pattern of the *in vitro* complex similar to that of the seeds. Although the 5_C resonances were seen at the same frequency as in the seed ENDOR spectrum, the $2'_C$ ENDOR resonances appeared at lower frequencies. Density functional calculations provide more insight into these ENDOR resonances.

Using *ab initio* density functional (DFT) calculations it was possible to calculate from first principles the principal g-values and hyperfine coupling constants of the radicals and address the assignment of these ENDOR resonances as well as the g-values. For (+)-catechin the energetically favored radical was centered on the catechol ring-B (Figure 4) with more than 85% of the unpaired electron spin localized on the O-C-C-O atoms and rest on the carbons 3, 4 and 5. With exception of the $2'_C$ carbon of ring C, the DFT EPR parameter were independent of rings A and C and could be omitted without consequence. The effect of the $2'_C$

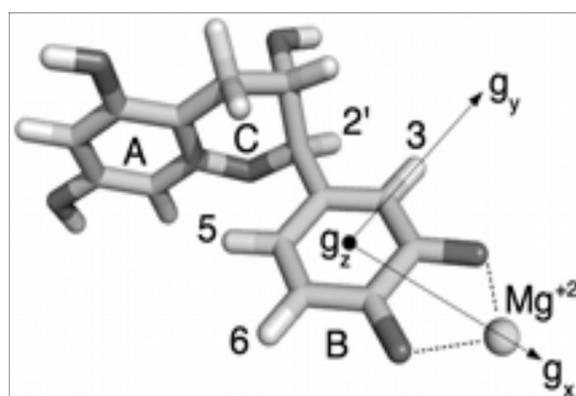


Figure 4. The structure of the computational model of the (+)-Catechin/Mg²⁺ radical complex. The directions of the principal g-values obtained from the calculations are also shown.

carbon and its proton could be quantitatively modeled using a methyl group substituent on ring B. As such the DFT calculations predicted that HFEPR and ENDOR spectra of (+)-catechin, however it has to be noted that its precursors dihydroquercetin, and leucocyanidin, would be essentially the same. The theoretical g-values of the model system depicted in Figure 4 and those of more minimal model molecules embedded in a solvent with a dielectric constant of 13 (pyridine) were 2.00549, 2.00475 and 2.00216 (and 2.00502, 2.00468 and 2.00215 when each of the semiquinone oxygen atoms was hydrogen-bonded to a water). These values were in good agreement with the experimentally measured values of the *in vitro* model and the narrow component in the seed spectra. Without the Mg^{2+} ion, the g-values were 2.00644, 2.00618 and 2.00212, the g_x and g_y values being somewhat greater than the model complex and broad seed component. The effect of dielectric constants was smaller than either water hydrogen-bonding or Mg^{2+} complexation.

The calculated ENDOR spectrum using the DFT derived hyperfine couplings for (+)-catechin/ Mg^{+2} were also in good agreement with the measured spectrum (Figure 3). The largest hyperfine coupling arose from the 5-position proton. The calculations showed that this coupling was particularly sensitive to hydrogen-bonding and metal complexation and, thus, would be sensitive to environmental disorder. Those would explain why in the experimental data the *in vitro* complexes presented broad resonances. The hyperfine coupling to the 2' proton on ring-C was the next largest. For well-understood reasons, this coupling depends on the orientation of the C_2 -H bond with respect to the plane of ring-B. The best fit of the data was for a dihedral angle of 5-10°. The energy optimal position was calculated to about 30°. [Footnote: The barrier to rotation between the two halves of the catechin radicals is expected to be energetically small and the difference may reflect the fact that the theoretical model is over-simplified with respect to solvent interactions that could affect the relative orientation of the two-halves.] The two smaller couplings common to the ENDOR spectra were consistent with the 3 and 6 position protons. This near quantitative agreement between DFT calculations and experimental spectra further supported the conclusion that a (+)-catechin-like radical was not only responsible for the narrow component in the HFEPR EPR spectra, but for the broad component as well. The difference between the two was environmental: the narrow corresponding to a more electropositive surrounding than the broad one.

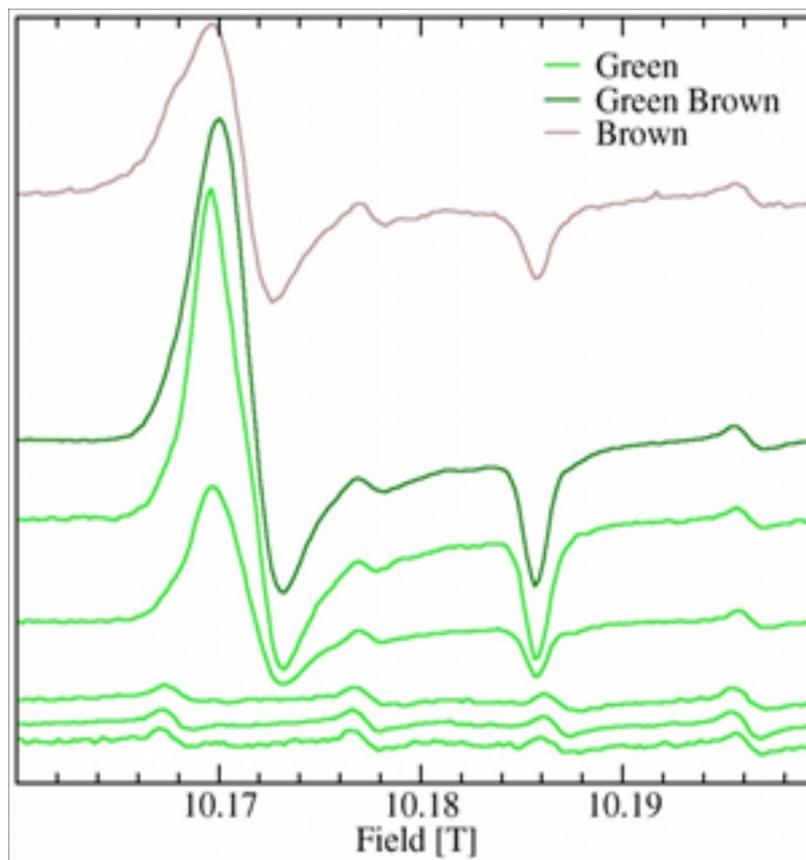


Figure 5. 4K 285 GHz EPR spectra of tobacco seed pods harvested from one plants with the youngest green pods with white seeds on the bottom (3 spectra). Green brown pods contained brown seeds. Top spectrum: mature seed pod.

In addition to the catechin radical lignin radicals may be present in the seed coat. Lignin radicals show a HFEPR spectrum (Bährle *et al.*, 2015) that is rather similar to the spectra obtained in Arabidopsis seeds shown in Figures 1 and 2. However, DFT calculations of the lignin radical predict larger coupling in an ENDOR spectrum for the lignin radical although the g-values of the HFEPR EPR spectra reported by Bährle and coworkers are very similar to the values reported above for the catechin radical.

Classical X-band EPR spectroscopy does not allow to identify the chemical nature of the radical in such complex material like seeds. Most of the spectra shown in the literature only show clearly the presence of Mn(II) and of iron cofactors of enzymes (see for example Kurdziel *et al.*, 2015). In green photosynthetically active tissues the signal of the stable tyrosine radical Try-D can be identified.

The Arabidopsis seed accumulate (+)-catechin exclusively in the seed coat while other flavonoids accumulate also in the embryo (Routabol *et al.*, 2006). The pigmentation of Arabidopsis seeds is not uniform, but shows a darker coloration around both the chalaza and the micropyle (Debeaujon *et al.*, 2001; Nesi *et al.*, 2002). If the seed radicals are indeed localized to these regions, then the actual local concentration of radical will be substantially higher than the 10 μM by at least an order magnitude and could conceivably approach 1 mM which although remarkable in and of itself has significant biological and chemical consequences.

The generation of the (+)-catechin radical appears to be related to seed development since the intensity of the HFEPR spectrum varies with age of the seed pod as shown here for tobacco (Fig. 5). Entire tobacco seed pods were examined as a function of their development to identify when radical forms. Green seed pod collected on the same day and from the same plant having white seeds had no radical while those with brown seeds did. Mature dark brown ones all contained the radical. These results suggest that radical is formed during seed maturation at a relative rapid rate and possibly associated the accumulation of the proanthocyanidins oxidation that leads to the browning of the testa.¹

It is known for Arabidopsis that the flavonoids accumulate as colorless compounds during the early steps of embryogenesis and subsequently give the seed its brown pigmentation after oxidative reactions during seed maturation and desiccation processes (Debeaujon *et al.*, 2000). In Arabidopsis the (+)-catechin content is the highest 7 days after

flowering, is slightly lower during the next 13 days but stays on a constant level and decreases then suddenly after 20 days to zero in the ripe mature seeds (Routabol *et al.*, 2006). The dynamics of the signal size of the catechin radical may reflect either the concentration of the catechin and its eventual reaction with ROS or a specific ROS-mediated reaction of catechin forming the radicals which are needed for a polymerization process and the synthesis of proanthocyanidins during certain stages of seed coat formation. Flavonoids in the seed coat in general serve as a protection barrier against UV and light damage, protect against insect predation, microbes and fungi (Mouradov and Spangenberg, 2015).

Whether the radical is indicative of damage or protection, its presence in such high concentrations also has further consequence for the seeds. During imbibition most of the seed radical was lost within 48 h (data not shown). However, no additional EPR signals were detected. Based on the known autooxidation chemistry of catechins, the simplest possibility is that imbibition leads to greater exposure to oxygen and water allowing the radical to react with either an oxygen or superoxide molecule to form the fully oxidized product of (+)-catechin and a molecule of either superoxide or peroxide. This would lead to a burst of reactive oxygen species in the endothelium, chalaza and micropylar region. Such an event may have an important biological function since it is known that ROS are required for germination (Müller *et al.*, 2009; Richards *et al.*, 2015).

Acknowledgements

This work was supported by ERC.KBBE.2012.1.1-01 (EcoSeed-311840) to S. U., C.B. and A. K.-L..

References

- Airianah OB, Vreeburg RA, Fry SC (2016) Pectic polysaccharides are attacked by hydroxyl radicals in ripening fruit: evidence from a fluorescent fingerprinting method. *Ann Bot.* 117(3):441-55
- Bährle C, Nick TU, Bennati M, Jeschke G, Vogel F (2015) High-Field Electron Paramagnetic Resonance and Density Functional Theory Study of Stable Organic Radicals in Lignin:

- Influence of the Extraction Process, Botanical Origin, and Protonation Reactions on the Radical g Tensor. *J Phys Chem A*. 119(24):6475-82.
- Barros J, Serk H, Granlund I, Pesquet E (2015) The cell biology of lignification in higher plants. *Ann Bot*. 115(7):1053-74.
- Berthold, T.; Bechtold, M.; Heinen, U.; Link, G.; Poluektov, O.; Utschig, L.; Tang, J.; Thurnauer, M. C.; Kothe, G. *J Phys Chem B* 1999, 103, 10733.
- Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 122(2):403-14.
- Debeaujon I, Peeters AJ, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M (2001) The TRANSPARENT TESTA12 gene of Arabidopsis encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell*.13(4):853-71.
- Faller P, Goussias C, Rutherford AW, Un S (2003) Resolving intermediates in biological proton-coupled electron transfer: a tyrosyl radical prior to proton movement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(15):8732-5
- Fry SC, Dumville JC, Miller JG (2001) Fingerprinting of polysaccharides attacked by hydroxyl radicals in vitro and in the cell walls of ripening pear fruit. *Biochem J*. 2001 Aug 1;357(Pt 3):729-37.
- Hawkins, C. L.; Morgan, P. E.; Davies, M. J. *Free Radical Biology and Medicine* 2009, 46, 965.
- Ivancich A, Dorlet P, Goodin DB, Un S (2001) Multifrequency high-field EPR study of the tryptophanyl and tyrosyl radical intermediates in wild-type and the W191G mutant of cytochrome c peroxidase. *J Am Chem Soc*. 123(21):5050-8.
- Kurdziel M, Dłubacz A, Wesełucha-Birczyńska A, Filek M, Łabanowska M (2015) Stable radicals and biochemical compounds in embryos and endosperm of wheat grains differentiating sensitive and tolerant genotypes--EPR and Raman studies. *J Plant Physiol*. 183:95-107

- Mouradov A, Spangenberg G (2014) Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Front Plant Sci.* 2014 Nov 10;5:620. doi: 10.3389/fpls.2014.00620. eCollection 2014
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol.*57:405-30
- Nakagawa K, Epel B (2014) Locations of radical species in black pepper seeds investigated by CW EPR and 9GHz EPR imaging. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 131:342-6.
- Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L (2001) The Arabidopsis TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* 13(9):2099-114.
- Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, McAinsh M, Davies JM (2015) The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *J Exp Bot.* 66(1):37-46.
- Routaboul JM, Kerhoas L, Debeaujon I, Pourcel L, Caboche M, Einhorn J, Lepiniec L (2006) Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of Arabidopsis thaliana. *Planta* 224(1):96-107
- Schopfer P, Liskay A, Bechtold M, Frahy G, Wagner A. (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta.* 214(6):821-8
- Stoll, S.; Shafaat, H. S.; Krzystek, J.; Ozarowski, A.; Tauber, M. J.; Kim, J. E.; Britt, R. D. *Journal of the American Chemical Society* 2011, 133, 18098.
- Yin, H.; Xu, L.; Porter, N. A. *Chemical Reviews* 2011, 111, 5944.

Article 3

J'ai dosé les ROS (O_2^- et H_2O_2) dans les graines des différents mutants. Cet article a été publié dans *Molecular Plant* en 2014.

Sechet J, Roux C, Plessis A, Effroy D, Frey A, Perreau F, **Biniak C**, Krieger-Liszkay A, Macherel D, North HM, Mireau H, Marion-Poll A (2015) The ABA-deficiency suppressor locus HAS2 encodes the PPR protein LOI1/MEF11 involved in mitochondrial RNA editing. *Mol Plant*. 2015 Apr;8(4):644-56.

Titre : Importance des ROS et des radicaux : de la graine à la membrane plasmique

Mots clés : ROS, radicaux, graine, membrane plasmique

Résumé : L'objectif de cette thèse est de définir l'effet de l'environnement maternel et des radicaux organiques sur la qualité des graines de *A.thaliana*, *H.annuus*, *B.oleracea* et *H.vulgare*, caractériser deux mutants d'*A.thaliana* affectés au niveau d'enzymes de la membrane plasmique et caractériser l'activité de ces deux protéines. Des dosages de $O_2^{\cdot-}$ et de radicaux ont été faits sur des graines issues de plantes ayant subi des stress thermique et/ou hydrique et aucun effet des stress n'a été observé. Des traitements de vieillissement accéléré ont eu des effets négatifs sur la vigueur et la viabilité des graines. Des radicaux ont été identifiés par RPE haut champ au niveau de l'enveloppe et du péricarpe. Cependant, étant donné la localisation de ces radicaux, ils ne sont pas de bons marqueurs de la qualité des graines. Des mutants KO d'*A.thaliana* de quinones réductases (QR) ainsi que de AIR12 ont été caractérisés. Les QR sont des enzymes cytosoliques ayant une affinité pour la membrane plasmique. Elles catalysent la réduction de quinones en dihydroquinones et jouent un rôle protecteur contre le stress oxydatif. A pH alcalin par contre, les dihydroquinones se déprotonent et s'autooxydent ce qui entraîne la formation de semiquinones et de $O_2^{\cdot-}$. AIR12 est un cytochrome b 561 ancré à la membrane plasmique du côté de l'apoplaste qui peut être réduit par l'ascorbate et le $O_2^{\cdot-}$. Ces protéines pourraient être impliquées dans un transfert d'électrons à travers la membrane plasmique via la vitamine K1. Les protéines recombinantes NQR et AIR12 ont été produites. Le potentiel rédox de NQR a été estimé à -209 mV. A pH alcalin, AIR12 est réduit par les semiquinones et pourrait ainsi récupérer les électrons du produit de NQR à pH alcalin. En présence de fragments de membrane plasmique d'hypocotyle de soja contenant de la vitamine K1, la production de $O_2^{\cdot-}$ est augmentée en présence de NQR et diminuée en présence de NQR et AIR12. Les QR semblent avoir un rôle anti-oxydant et pro-oxydant selon les cas et que AIR12 un rôle anti-oxydant. Le transfert d'électrons entre les deux protéines pourrait se faire via les semiquinones à pH alcalin et via $O_2^{\cdot-}$.

Title : Importance of ROS and radicals : from seed to the plasma membrane

Keywords : ROS, radicals, seed, plasma membrane

Abstract: The aim of this work is to define the effects of adverse environmental conditions on seed quality of *A.thaliana*, *H.annuus*, *B.oleracea* et *H.vulgare*, characterize two *A.thaliana* mutants affected in plasma membrane proteins and characterize the activity of the two proteins. Seeds were harvested from plants subjected to drought and/or thermal stress. Then $O_2^{\cdot-}$ and organic radicals in seeds were measured showing no impact of the stress. Accelerated ageing had a negative effect on seed vigor and viability. Radicals have been identified by high field EPR in the testa and pericarp. There was no correlation between these radicals and the seed quality, therefore these radicals were not found to be good markers of seed quality. *A.thaliana* KO mutants of quinone reductase (QR) and AIR12 have been characterized. QR are cytosolic enzymes that have an affinity for the plasma membrane. QR catalyze the reduction of quinone to dihydroquinone. Thus they are known to be protective enzymes against oxidative stress. However, at alkaline pH, dihydroquinone deprotonize and form semiquinones and $O_2^{\cdot-}$. AIR12 is a b561 cytochrome anchored to the apoplastic side of the plasma membrane. These proteins could be implied in a transmembrane electron transport via vitamin K1. Recombinant proteins and NQR and AIR12 were produced. At alkaline pH, AIR 12 was reduced by the semiquinone, AIR12 could form a redox couple with vitamin K1 as electron shuttle across the membrane. In the presence of plasma membrane, the production of $O_2^{\cdot-}$ was increased with NQR and reduced with NQR and AIR12. QR appear to have an anti-oxidant role and pro-oxidant role according to the conditions and AIR12 an anti-oxidant role. Electron transfer between the two proteins could be done via the semiquinone at alkaline pH and via $O_2^{\cdot-}$.