



HAL
open science

Importance de l'homéostasie du NAD dans la productivité et la résistance aux stress chez *Arabidopsis thaliana*

Linda de Bont de Bont

► **To cite this version:**

Linda de Bont de Bont. Importance de l'homéostasie du NAD dans la productivité et la résistance aux stress chez *Arabidopsis thaliana*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112283 . tel-02970320

HAL Id: tel-02970320

<https://theses.hal.science/tel-02970320>

Submitted on 18 Oct 2020

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Institut de Biologie des Plantes

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenance prévue le Vendredi 17/10/2014

par

Linda de BONT

Importance de l'homéostasie du NAD dans la
productivité et la résistance aux stress chez
Arabidopsis thaliana

Composition du jury :

<i>Directeur de thèse :</i>	Bertrand GAKIERE	Maître de Conférences (Université Paris-Sud)
<i>Rapporteurs :</i>	François BOUTEAU Yves GIBON	Maître de Conférences (Université Paris-Diderot) Directeur de Recherches (INRA Bordeaux)
<i>Examineurs :</i>	Guillaume TCHERKEZ Dao-Xiu ZHOU	Professeur (Université Paris-Sud) Professeur (Université Paris-Sud)
<i>Président du jury :</i>	Anis LIMAMI	Professeur (Université d'Angers)

Résumé - Abstract

Le développement et le fonctionnement harmonieux des plantes dépendent de cofacteurs comme le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Outre ses rôles dans le recyclage rédox, le NAD est aussi impliqué dans des processus de signalisation cellulaire, particulièrement sollicités en situation de stress. Cela fait du NAD l'un des déterminants majeurs de l'homéostasie énergétique des plantes et donc des rendements des cultures. Par une approche de génétique inverse ciblant la L-aspartate oxydase (AO), première enzyme de la voie de biosynthèse du NAD, nous avons obtenu des plantes aux teneurs constitutivement augmentées et diminuées en nucléotides à pyridine. L'étude de ces plantes a permis d'établir que (1) le NAD stimule la croissance, le développement et la productivité des plantes, (2) coordonne les métabolismes photosynthétique, respiratoire et azoté, et (3) intervient dans les mécanismes de résistance aux stress biotiques et abiotiques. Les travaux cités ci-dessus font l'objet d'une valorisation industrielle.

Mots-clef : NAD, *Arabidopsis thaliana*, L-aspartate oxydase, rendement, métabolisme, stress abiotique et biotique.

The harmonious development and functioning of plants depend on several cofactors such as nicotinamide adenine dinucleotide. Besides its roles in redox recycling, the NAD is also involved in cellular signalling processes, which are central actors in stress situations. The NAD is thus one of the main determinants of plant energy homeostasis, and therefore of crop yield. Through a reverse genetics approach targeting the L-aspartate oxidase (AO) – the first committed enzyme of NAD biosynthesis – plants with constitutive either increased or decreased levels of pyridine nucleotides have been obtained. A further study of these plants enabled to show that the NAD (1) can improve the growth, development and productivity of plants, (2) coordinates photosynthetic, respiratory and nitrogen metabolisms, and (3) acts upon biotic and abiotic stress resistance mechanisms. This research is being valued industrially.

Keywords : NAD, *Arabidopsis thaliana*, L-aspartate oxidase, yield, metabolism, abiotic/biotic stresses.

" Venez et changez quelque chose, ne vous contentez pas de venir parler."

Leymah Gbowee

Prix Nobel de la Paix, 2011

Remerciements

Après trois ans passés à l'Institut de Biologie des plantes, il est grand temps pour moi de remercier tous ceux qui d'une façon ou d'une autre ont contribué à sa réalisation.

En premier lieu "mon chef", Bertrand Gakière. Merci de m'avoir donné ma chance, ce qui était loin d'être gagné, il y a trois ans et demi, et de m'avoir formé. Tu m'as également laissé beaucoup (trop ?) de liberté, ce qui m'a permis de donner des directions très personnelles à ma thèse. La confiance que tu as portée en moi, ton soutien et tes encouragements ont été un facteur déterminant de ma réussite. Merci pour ton aide précieuse tout au long de ces années et plus particulièrement pendant la rédaction de ce mémoire. Travailler avec toi a vraiment été une chance aussi bien d'un point de vue scientifique que personnel.

Je tiens à remercier Yves Gibon et François Bouteau de m'avoir fait l'honneur de juger ce mémoire en tant que rapporteurs. Je remercie également Anis Limami, Dao-Xiu Zhou et Guillaume Tcherkez d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Merci à Michel Dron directeur du laboratoire, pour son accueil au sein de l'Institut de Biologie des plantes (IBP), pour sa confiance dans mon projet de thèse et d'avoir mis à disposition les outils et les moyens nécessaires au bon déroulement de ma thèse.

Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans l'aide Marie Garmier et Sophie Massot, c'est pourquoi je tiens à leur exprimer ici toute ma reconnaissance. Toutes les fois où j'ai eu la chance et le plaisir de travailler à vos côtés, vous avez toujours fait preuve de professionnalisme, de minutie et d'enthousiasme et en plus vous nous avez même pris soin de moi en amenant le petit déjeuner les matins de la toute fin de rédaction. Un grand merci à vous deux.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse Anne Krapp et Juergen Kroymann pour leur très bon conseil sur le déroulement de leur thèse, leur gentillesse et leur disponibilité.

Un très grand merci à Michael Hodges, chef de l'équipe Signalisation Régulation et Interactions Métaboliques. Merci pour tes encouragements et ton soutien pendant ces trois ans. Je remercie également toute les autres membres de l'équipe, Nat ' & Céline bien sûr, Mathieu & Younès, Guillaume, Sam & Cyril. Merci également à Jean, Françoise et Chantal, Aline, Martine et Valérie. Merci à tous pour ces bons moments passés. Un grand merci aussi à Jingfang qui va continuer de faire vivre le sujet NAD, merci pour tous les bons moments surtout lors de tes cours d'initiation au chinois. Je te souhaite plein de courage pour ta thèse. Merci énormément à Pierre de m'avoir formée quand j'étais en Master 2, Merci pour ta patience, pour tes conseils judicieux, et aussi pour ton soutien pendant ma dernière année.

Mille mercis à Edouard. En plus d'être un super binôme de paillasses, tu as continué à me soutenir et m'encourager une fois parti et ce jusqu'aux corrections final du manuscrit. Merci pour ta bonne humeur, pour ton entrain et pour toutes les bières (et les camomilles) lors des « nocturnes » au labo.

Un immense merci aux filles de la plateforme Métabolisme Métabolome. Avec vous toutes j'ai eu la chance d'interagir à l'IBP mais aussi en dehors. Vous avez contribué à un grand nombre de résultats de ma thèse et travailler avec vous a toujours été un grand plaisir. Merci à Françoise pour son aide lors des analyses par GC-MS, et pour les séances de sport à l'X. Merci à Caroline pour les analyses en d'acides aminés par HPLC et pour les sorties et les footings. Merci à Florence pour les dosages d'hormones par LC-MS et pour les sorties à la piscine et aux concerts. Merci à Valérie, pour ses aides techniques en informatique, pour son aide lors de mon déménagement et pour le sport en général. Merci à Marlène pour les analyses par EA-IRMS et pour m'avoir motivée à faire le tri-relais de la fac, une médaille de bronze ça ne s'oublie pas !

Un grand merci à Marina et Juergen de l'ESE, pour leur présence leur aide et leur conseil sur mon chapitre pucerons. J'en profite également pour remercier Maisera pour sa bonne humeur lors de mes passages à l'ESE.

Merci à Anne Krapp de l'INRA de Versailles et à Vivi pour leur aide sur les expériences en hydroponie.

Je tiens également à remercier Gabriel Cornic de l'ESE pour son aide sur la mise en place du stress hydrique et pour m'avoir initiée aux mesures de potentiels hydriques.

Mes remerciements vont également à Anja Krieger-Liszky du CEA pour les mesures de ROS, merci pour ta patience, tes conseils et ta gentillesse.

Je remercie également Sébastien de la plateforme IMAGIF pour m'avoir initié aux techniques de microscopie et Séverine de l'IBP qui m'a aidé pour l'utilisation du stéréomicroscope qui m'a donné des conseils pour la rédaction des parties abordant la microscopie.

Je tiens également à remercier à tous les membres de l'IBP, surtout Jean-Paul et Eric, je ne compte plus les fois où j'ai crevé à vélo, où les freins m'ont lâché et autres péripéties. Merci à Véronique pour son aide lors de mes derniers repiquages de plante. Merci à Gilles d'avoir fait en sorte que je puisse réaliser le stress combiné « forte lumière forte température ». Merci à Audrey et Maryelle pour leurs encouragements. Je remercie aussi Catherine, Sophie et Gilles pour les services communs, leur bonne humeur et leurs conseils. Merci également à Delphine, ma collègue du troisième étage de l'IBP, qui est désormais à Paris.

Merci à la SFBV pour m'avoir octroyé la bourse « jeunes chercheur » et ainsi permettre de partir en congrès au MPMI à Rhodes et merci à Emmanuelle pour sa bonne humeur lors de ce congrès inoubliable.

Durant ces trois années, j'ai eu la chance de former de près ou de loin un certain nombre de stagiaires : Du, Antoine, Kévin & Thomas, Jessica & Quentin, Clémentine et Atem. Merci à vous tous pour votre bonne humeur et pour les bons moments passés. Vous avez tous faits du très bon travail. Faites de votre mieux pour la suite !

Merci à Jacqui et Marianne, directrice et vice-directrice de l'École doctorale Sciences du Végétal 145. Merci à toutes les deux pour votre gentillesse, pour vos encouragements. Merci aussi pour votre aide pour l'organisation, le bon déroulement des PhD days et pour toutes les formalités administratives. Marianne, tu étais également ma tutrice pour le monitorat. Merci beaucoup pour tes conseils et ta présence.

Un grand merci à mes collègues enseignant, Marianne, Céline Charon, Dara, Moussa et Yves qui m'ont formé lors de ma première année de monitorat. J'ai passé de supers moments auprès de vous et avec les étudiants.

Merci également à Marie Dufresne pour ton soutien sur les moments difficiles. Je n'oublierai pas non plus de te remercier pour tes conseils pour mes enseignements, aussi bien d'un point de vue pédagogique qu'administratif. Tu connais toutes les ficelles du milieu, et, sans ton soutien et ton expérience d'enseignant. J'en profite également pour remercier Audrey pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

En trois ans, on en côtoie des thésards dans un labo... Un grand merci à tous ceux qui sont déjà partis pour les bons moments passés : Erwan & Anso, Shengchun & Yi, Guillaume & Thomas, Yuan, Laurine, Laure. Et merci à tous les nouveaux : Sylviane, Jean-Claude, Manon, Chouaib, Caro, Cécile, Quentin, Younès, Zheng, Teddy, Tingting. Une petite pensée spéciale pour les thésards actuellement en rédaction, Quentin, Jean-Claude, Caroline et Manon, surtout solidaires et on ne lâche rien !

Un grand merci à tous les membres de Doc' en herbe, l'association des doctorants de l'ED. Chloé, Stéphane, Adrien & Denis, Marie-Capucine, Céline, Viviane, Mika, Lucille, Cécile, Yasmine, Marjorie, Kader, Aurélien pour les bons moments passés lors des réunions Doc' en herbe, des EPSR et de l'organisation des PhD days. Je tiens plus particulièrement à remercier Kader qui m'a énormément soutenu sur la fin de ma thèse pour son écoute et ses encouragements sans limite.

Bien sûr, en tant qu'étudiant en thèse, on ne fait pas que travailler... Je tiens à remercier tous mes amis et tout particulièrement Aude & Marine pour avoir pris soin de moi, pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble, pour votre soutien, votre gentillesse et votre présence. Un énorme merci à mes collègues-amis-thésards, Sylviane, Jean-Claude, Caro, Adrien, Cécile et Manon. Merci d'être là, tout simplement.

Un grand merci à mes deux sœurs pour leur aide, leur bonne humeur et leur soutien. Un grand merci également à Vincent et à la petite Cosima pour ses dessins ses blagues et ses chansons. Enfin, je tiens à adresser comme il se doit, mes plus grands remerciements à mes parents, merci pour votre patience, pour votre soutien infini et vos encouragements qui m'ont été si précieux durant toute cette thèse. Cette thèse, c'est indéniablement aussi la votre !

Abréviations

AAT2	Aspartate aminotransférase
ABA	Acide abscissique
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN-T	ADN de transfert
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
ADPR	ADP-ribose
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
AO	L-aspartate oxydase
AOX	Alternative oxydase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARR	<i>Auxin response factor</i>
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
Avr	Avirulent
BER	Base excision repair
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Albumine de sérum bovin
cADPR	Adénosine 5'-diphosphate ribose cyclique
CaM	Calmoduline
CaMV	Virus de mosaïque du chou-fleur
Ci	Concentration en CO ₂ dans le mésophylle (ppm)
cfu	Unité formant une colonie
CMS	<i>Cytoplasmic male sterility</i>
DCPIP	2,6-dichlorophénol-indophénol
DH	Déficit hydrique
DHA	Dihydroxyacétone
Dnase	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxyribonucléotides
DO	Densité optique
DTNB	Acide dithionitrobenzoïque
DTT	Dithiothréitol
E	Taux de transpiration
EA-IRMS	<i>Elemental Analysis - Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>
EDTA	Ethylène diamine tétra acétique
elf	<i>Elongation factor</i>
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i>
ETR	Electron transport rate
FAD	Flavine adénine dinucléotide
Fd	Ferrédoxine
flg	Flagelline
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
GA	Acide gibbérellique
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
GDC	Glycine décarboxylase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GOGAT	Glutamate synthase
GPDH	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
GR	Glutathion réductase
gS	Conductance stomatique
GS	Glutamine synthétase
GSH	Glutathion réduit

GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-transférase
HAT	Histone acétyl transférase
HDAC	Histone déacétylase
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
hpi	Heure post-inoculation
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HR	Réaction d'hypersensibilité
ICDH	Isocitrate déshydrogénase
IAA	Acide indol-acétique
ICDH	Isocitrate déshydrogénase
INPI	Institut National de la Propriété Intellectuelle
IP3	Inositol tri-phosphate
JA	Acide jasmonique
Km	Constante de Michaëlis-Menten
LAT	Lysine acétyl-transférase
LB	Luria Bertani
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LP	<i>left primer</i>
MAMP	<i>Microbe-associated molecular pattern</i>
MDH	Malate déshydrogénase
mETC	Chaîne de transfert d'électrons mitochondriaux
MF	Matière fraîche
MS	Matière sèche
ms	Milliseconde
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide.
NaAD	Nicotinate adénine dinucléotide
N(a)MNAT	Nicotinamide mononucléotide adényltransférase
NA	Nicotinate
NaAD	Acide nicotinique adénine dinucléotide
NaADP	Acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	NAD, forme réduite
NADK	NAD kinase
NADP	NAD phosphate
NADPH	NAD phosphate, forme réduite
NADS	NAD synthétase
NaG	N-nicotinate glycoside
NAMN	Acide nicotinique mononucléotide
NaPT	Acide nicotinique phosphoribosyltransférase
NaR	Nicotinate riboside
NDA,B,C	NADPH déshydrogénase A,B,C
NDI	Inhibiteur de NADPH déshydrogénase
NDT	Transporteur de nucléotides/nucléosides
NIC	Nicotinamidase
NiR	Nitrite réductase
NR	Nitrate réductase
NRT	Transporteur de nitrates
OAA	Acide oxaloacétique
2-OG	2-oxoglutarate
OPA	ortho-phthalaldéhyde
OPP	Cycle oxydatif des pentoses phosphates
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PAP	polyA Polymérase
PAR	Rayonnement Photosynthétiquement Actif
PARG	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
pb	paire de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pETC	Chaîne de transfert d'électrons chloroplastiques

PEP	Phosphoenol pyruvate
Pi	Phosphate inorganique
PMM	Plateforme Métabolisme Métabolome
PMS	Phénazyne méthosulfate
PMSF	Phénylméthanesulfonide fluorure
Ppm	Parties par millions, en volume
PR	<i>Pathogenesis related protein</i>
PRX	Peroxydase
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
pv.	Pathovar
PVP	Poly-vinyl-pyrrolidone
PXN	Péroxydase
QPT	Quinolinate phosphoribosyltransférase
qRT-PCR	PCR quantitative
QS	Quinolinate synthase
qsp	Quantité suffisante pour
RBOH	<i>Respiratory burst oxidase homologue</i>
RCD	<i>Radical cell death</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RP	<i>right primer</i>
RT	Réverse transcription
RuBP	Ribulose 1,5-bisphosphate
RWC	Contenu relatif en eau
SA	Acide salicylique
SAR	Résistance systémique acquise
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SHMT	Sérine hydroxyméthyltransférase
Sir	<i>Silent information regulator</i>
SIRT	Sirtuines
SOD	Superoxyde dismutase
SRO	<i>Similar to rcd one</i>
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
TCA	Cycle des acides tricarboxyliques
THF	Tétrahydrofolate
TRIS	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TRX	Thiorédoxine
UV	Ultra violet
VPD	Déficit de pression de vapeur

Sommaire

Sommaire	1
Préambule	13
Introduction	15
I- Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide	15
A- Les propriétés physico-chimiques du NAD	16
B- Les voies de synthèse du NAD chez les plantes	17
1) La biosynthèse de novo du NaMN chez les plantes : la quinolinate phosphoribosyltransférase	19
2) La biosynthèse du quinolinate chez les plantes : la L-aspartate oxydase et la quinolinate synthase	22
a- La L-aspartate oxydase	22
b- La quinolinate synthase	25
3) La conversion du NaMN en NAD chez les plantes	26
a- La nicotinate mononucléotide/nicotinamide mononucléotide adényltransférase (NaMN/NMNAT)	27
b- La NAD synthétase	28
4) Interconversion du NAD en NADP	30
a- La NAD kinase	30
b- La NADP phosphatase (NADPPase)	33
II- Le catabolisme du NAD	34
A- Utilisation du NAD et du NADP par les adénosine-5'-diphosphate-ribosyl- cyclases (ADPR cyclases)	35
B- Utilisation du NAD par les mono et poly-ADP-ribose-polymérasés (PARP)	38
C- Réversion de la parpylation par les poly-ADP-ribose glycohydrolases (PARG)	40
D- Utilisation du NAD et ses dérivés par les Nudix hydrolases	41
E- Utilisation du NAD par les histones désacétylases de type SIRT	43

III-	Les voies de recyclage du NAD : le cycle des nucléotides à pyridine-----	45
A-	La voie de recyclage directe du nicotinamide mononucléotide en NAD ----	45
B-	La voie de recyclage du nicotinamide produit par les ADPR cyclases, les PARP et les Sirtuines -----	46
1-	La nicotinamidase -----	47
2-	La nicotinate phosphoribosyltransférase -----	48
3-	Les enzymes communes à la voie de synthèse de novo-----	49
C-	Les autres voies de recyclage du NAD connectées au cycle des nucléotides à pyridine -----	50
1-	Un recyclage du NAD via le NMN-----	50
a-	Du NMN au nicotinamide en une étape -----	51
b-	Du NMN au nicotinamide en deux étapes par le NR-----	52
c-	Du NMN au NaMN en trois étapes -----	52
2-	La synthèse de novo de nicotinate-----	52
a-	Synthèse <i>de novo</i> de nicotinate en une étape-----	52
b-	Synthèse <i>de novo</i> de nicotinate en deux étapes via le NaR -----	53
D-	La biosynthèse des métabolites secondaires dérivés du nicotinate et du nicotinamide (localisation, transport, remobilisation)-----	53
1-	Dérivés du nicotinate-----	53
a-	La nicotine, l'anatabine et l'anabasine -----	53
b-	Le N-méthylnicotinate : la trigonelline-----	55
c-	Le nicotinate glycoside (NaG)-----	56
2-	Les dérivés du nicotinamide -----	57
a-	La ricinine -----	57
b-	Le N-méthylnicotinamide -----	57
IV-	La compartimentation et le transport subcellulaires du NAD chez les plantes	59
A-	Distribution intracellulaire-----	59

B-	Le passage des équivalents rédox NAD(P)/H entre les différents compartiments -----	62
C-	Le transport intracellulaire des nucléotides à pyridine -----	64
D-	Le transport extracellulaire des nucléotides à pyridine -----	65
1-	Transport des formes de stockage et d'alcaloïdes et trigonelline -----	66
2-	Vers un rôle plus général de contrôle des systèmes de transport chez les plantes -----	68
V-	Les fonctions du NAD -----	68
A-	Les fonctions rédox du NAD et leurs implications -----	69
1-	Les couples rédox NAD(P) ⁺ /NAD(P)H -----	69
2-	Le rôle du NAD(P)H dans le maintien du potentiel rédox cellulaire -----	70
B-	Le rôle du NAD(P)/H dans les grandes voies métaboliques -----	73
1-	Le NAD(P)H dans le métabolisme carboné -----	74
a-	Le NADPH et la fixation du carbone après réactions de photolyse ----	74
b-	La production de NADP -----	75
c-	Impact de l'importance du NADP(H) dans le métabolisme primaire de la plante -----	76
2-	Le NAD(P)/H et le métabolisme azoté -----	79
C-	Le rôle du NAD(P)/H dans les processus développementaux -----	83
1-	Le rôle du NAD dans la germination des graines -----	84
2-	Le rôle du NAD(P)(H) dans la reproduction sexuée -----	85
3-	Le rôle du NAD dans le développement racinaire -----	88
D-	Le NAD dans les réponses aux contraintes de l'environnement -----	89
1-	Le rôle du NAD dans les réactions de défense face aux pathogènes ----	89
2-	Le rôle du NAD(P)/H dans la réponse aux stress abiotiques -----	92
E-	Le rôle central de l'homéostasie du NAD dans la croissance, le développement et la production de biomasse des plantes. -----	95
	Objectifs du travail de thèse -----	97

Résultats	99
Chapitre I	99
Obtention de plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> aux teneurs en NAD constitutivement altérées	99
I- Production et caractérisation moléculaire des lignées transgéniques dérégulées pour la production d'AO chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
A- Obtention de plantes mutantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> homozygotes pour l'insertion de l'ADN-T dans le gène AO	99
B- Surexpression constitutive de l'ADNc codant l'AO d' <i>Arabidopsis thaliana</i> 101	
C- Les niveaux de transcrits AO mesurés chez mAO1 et mAO2 sont drastiquement réduits	102
D- Les lignées surpresseur 35S::AO ont des niveaux de transcrits AO fortement augmentés	103
II- Caractérisation biochimique des lignées sur- et sous-produisant l'AO	103
A- L'activité AO est corrélée à celle des transcrits chez les lignées transformées	103
B- La production de L-aspartate oxydase conditionne les teneurs en NAD et en ATP chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	104
III- Les teneurs en NAD conditionnent le phénotype morphologique des lignées mutantes	107
IV- Discussion	109
A- Les mutants mAO homozygotes pour le gène de l'AO sont non létaux	110
B- La mise au point d'un test d'activité AO in planta a permis de quantifier la production d'AO dans les plantes	111
C- L'AO exerce un contrôle clef sur la production de NAD et l'homéostasie énergétique des plantes	113
D- L'altération du pool de nucléotides à pyridine affecte la croissance des plantes aux teneurs en AO dérégulées	115
Chapitre II	117

Impact des niveaux de NAD sur la croissance et le développement des plantes	117
I- Les niveaux de NAD sont corrélés à la capacité germinative	117
II- Les niveaux de NAD sont étroitement corrélés à la croissance des plantes et leur production de biomasse	119
III- Les plantes aux niveaux de NAD modifiés ont des paramètres de croissance similaires à ceux des plantes témoins	122
IV- Le rendement en grains est fonction des teneurs en nucléotides à pyridine dans les plantes	125
V- Discussion	127
A- Des plantes riches en énergie pour augmenter durablement les rendements	127
B- Pourquoi les plantes poussent-elles mieux ?	130
Chapitre III	133
Conséquences physiologiques des modifications des niveaux de NAD sur les échanges gazeux chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	133
I- Les échanges de CO ₂ et d'O ₂ varient en fonction des niveaux de NAD	133
II- Les échanges d'eau des plantes sont altérés par les niveaux de NAD	136
III- Les teneurs en NAD influencent la taille des ostioles mais pas l'index stomatique	140
IV- Discussion	141
Chapitre IV	145
Conséquences métaboliques des modifications des niveaux de NAD chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	145
I- Les niveaux de NAD influent sur la machinerie photosynthétique et la fixation du CO ₂ atmosphérique	145
II- Les niveaux de NAD influent sur la synthèse de molécules carbonées	147
III- Les niveaux de NAD influent sur la synthèse des acides aminés	151
IV- Les niveaux de NAD modifient les contenus en azote chez les lignées étudiées	152

V-	L'expression de l'AO influe sur l'assimilation de l'azote -----	153
VI-	La richesse en NAD ne modifie cependant pas l'incorporation de nitrates par les plante -----	156
VII-	Discussion-----	158
A-	L'augmentation des teneurs en nucléotides à pyridine stimule les métabolismes carbonés et azotés de manière coordonnée -----	158
B-	Le ménage à trois entre photosynthèse, respiration et assimilation de l'azote se déséquilibre lorsque les teneurs en NAD sont insuffisantes -----	160
	Chapitre V-----	162
	Impact des niveaux de NAD sur la résistance aux stress abiotiques chez <i>Arabidopsis thaliana</i> -----	162
I-	Les plantes riches en NAD sont plus résistantes à un stress chaleur/lumière 162	
II-	Les niveaux de NAD influencent la résistance des plantes à la sécheresse 163	
III-	La mesure du contenu en eau du sol -----	168
IV-	La réponse différentielle des plantes au stress hydrique s'accompagne d'une modification du profil hormonal -----	169
V-	Discussion-----	173
A-	Des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> adaptées au climat tropical ? -----	173
B-	Des plantes légèrement plus sensibles à la sécheresse mais plus résistantes au stress hydrique ?-----	174
C-	La résistance à la sécheresse est conditionnée par l'antagonisme ABA-cytokinines ?-----	177
	Chapitre VI-----	179
	Impact des niveaux de NAD sur la prolifération des pucerons chez <i>Arabidopsis thaliana</i> -----	179
I-	Description du pathosystème <i>Arabidopsis thaliana</i> – <i>Myzus persicae</i> -----	179
II-	Les niveaux de NAD influent sur la prolifération des pucerons-----	181

III- La présence de pucerons sur les plantes s'accompagne d'une modification des pools de NAD et de glutathion-----	182
IV- Le profil des indoles glucosinolates est altéré chez les mutants <i>mAO</i> pauvres en NAD-----	184
V- Les transcrits <i>PR1</i> sont fortement accumulés chez les plantes plus sensibles aux pucerons et sont constitutivement exprimés dans les plantes riches en NAD-----	186
VI- Discussion-----	187
Chapitre VII-----	189
Rôle de l'aspartate oxydase dans la résistance -----	189
d' <i>Arabidopsis thaliana</i> à des microorganismes pathogènes-----	189
I- Rôle de l'aspartate oxydase dans la résistance d' <i>Arabidopsis thaliana</i> à des microorganismes pathogènes-----	189
A- Présentation des principaux concepts et termes employés dans cette étude -----	189
B- Eléments préliminaires quant à un rôle pour l'AO dans la résistance d' <i>Arabidopsis</i> aux agents pathogènes et objectifs de ce travail -----	191
C- L'AO est impliquée dans la résistance à Pst mais pas à Pst-AvrRpm1-	194
D- Rôle de l'AO dans la résistance à Pst au niveau de la barrière épidermique-----	195
E- L'expression de l'AO est induite en réponse à Pst-----	198
F- Les niveaux de NAD/P(H) varient en réponse à Pst-----	199
G- Les défenses basales sont modifiées dans les lignées <i>mAO</i> et <i>35S::AO</i>	202
H- L'AO est impliquée dans la résistance à <i>Botrytis cinerea</i> , un champignon nécrotrophe-----	206
II. Discussion et conclusions-----	207
A- L'homéostasie du NAD/P(H) influence la résistance aux agents pathogènes chez <i>Arabidopsis</i> -----	207

B- L'AO : Impliquée dans la résistance basale à Pst, mais pas dans la résistance spécifique à Pst-AvrRpm1 ? -----	209
1- Rôle de l'AO dans la PTI et la fermeture des stomates -----	209
2- Un rôle pour l'AO et le NAD/P(H) dans l'ETI ?-----	210
C- Quel(s) rôle(s) pour l'AO et le NAD/P(H) dans la résistance basale à Pst ? 214	
Conclusion générale et perspectives-----	217
Matériel & Méthodes-----	221
I. Matériels biologiques-----	221
A- Matériel végétal : Présentation des lignées d'Arabidopsis thaliana-----	221
B- Conditions de culture des plantes-----	222
1- Cultures en pots sur terreau -----	222
2- Cultures hydroponiques d'Arabidopsis thaliana -----	223
3- Cultures in vitro -----	223
C- Souches bactériennes et fongique-----	224
1- Agents pathogènes -----	224
2- Autres souches bactériennes -----	224
II. Obtention des lignées transgéniques -----	225
A- Transformation d'Arabidopsis thaliana par Agrobactéries-----	225
B- Sélections des plantes transformées-----	225
1- Sélection sur kanamycine-----	225
1- Sélection sur Basta®-----	225
III. Techniques d'études moléculaires-----	226
A- Amorces oligo-nucléotidiques utilisées dans ce travail -----	226
B- Criblage par PCR des insertions d'ADN-T dans les mutants d'Arabidopsis thaliana -----	226
1- Extraction d'ADN génomique à partir d'échantillon foliaire-----	226
2- Amplification par PCR-----	226

3- Electrophorèse en gel d'agarose -----	227
4- Transformation des Agrobactéries par électroporation -----	227
5- Séquençage des fragments d'ADN -----	228
IV. Etude des niveaux de transcrits de gènes d'intérêt par RT-qPCR -----	228
A- Extraction et dosage d'ARN -----	228
B- Synthèse des ADN complémentaires par transcription inverse -----	229
C- PCR quantitative (qPCR)-----	229
1- Conception des amorces RT-qPCR -----	229
2- PCR quantitative-----	230
V. Techniques d'études des protéines -----	230
A- Extraction des fractions solubles aqueuses foliaires -----	230
B- Dosage des protéines totales -----	230
1- Dosage à 280 nm -----	230
2- Dosage selon la méthode dite de Bradford -----	231
C- Mesure de l'activité nitrate réductase (NR) -----	231
1- Extraction-----	231
2- Mesure de l'activité extractible -----	231
D- Dosage de l'activité Rubisco -----	232
E- Dosage de l'activité phosphoénol pyruvate carboxylase (PEPc)-----	232
F- Mise au point du dosage de l'activité L-aspartate oxydase -----	233
VI. Techniques d'études métabolomiques -----	233
A- Dosage du pool d'antioxydants cellulaires. -----	233
1- Extraction acide-----	234
2- Extraction alcaline-----	235
3- Dosage des chlorophylles-----	235
4- Dosage des nucléotides à pyridine -----	236
a) NAD ⁺ et NADH-----	236

b) NADP+ et NADPH-----	236
5- Dosage du glutathion-----	236
B- Mesure des ions nitrates -----	237
C- Mesure des ions ammonium -----	237
D- Dosage du glucose -----	238
E- Dosage de l'amidon-----	238
F- Dosage des acides aminés par technique HPLC -----	238
1- Extraction méthanolique des métabolites -----	238
2- Quantification absolue des acides aminés en HPLC-----	239
a) Dérivatisation des échantillons -----	240
b) Conditions chromatographiques -----	240
c) Préparation des solutions d'acides aminés standards-----	240
d) Préparation des échantillons-----	240
e) Conditions d'injection des standards et échantillons-----	241
G- Profilage métabolique par technique GCMS -----	241
1- Extraction méthanolique des métabolites -----	241
2- Préparation du réactif de méthyoxymation et du mélange d'alcane -----	241
a) Double dérivation des échantillons -----	241
b) Méthode GC-MS -----	243
H- Dosage des pools d'acide salicylique libre par technique HPLC -----	243
1- Extraction-----	243
2- Dispositif expérimental -----	244
3- Quantification des pools libres -----	244
4- Calcul du rendement de l'extraction par comptage radioactif -----	244
5- Traitement et comparaison des données-----	245
I- Dosage des glucosinolates par HPLC -----	245
1- Méthode d'extraction -----	245

2-	Analyse -----	245
J-	Dosage des hormones par LC-MS-----	246
1-	Extraction des échantillons -----	246
2-	Purification des échantillons par SPE (« sample preparation »)-----	246
3-	Préparation des échantillons pour le couplage LC-MS -----	247
K-	Analyses par couplage EA-IRMS -----	247
VII.	Approches physiologiques-----	248
A-	Stress biotiques-----	248
1-	Bactérie -----	248
a)	Cultures des bactéries <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>Pst</i>) ----	248
b)	Inoculations de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> -----	249
c)	Tests de résistances des plantes vis-à-vis de <i>Pst</i> et <i>Pst-AvrRpm1</i> -	249
1)	Test de résistance par infiltration des souches bactériennes ----	249
2)	Test de résistance par pulvérisation des bactéries <i>Pst</i> -----	250
d)	Inoculation et échantillonnage pour les analyses métabolomiques et transcriptomiques -----	251
2-	Champignon -----	251
3-	Pucerons -----	251
a)	<i>Myzus persicae</i> -----	251
b)	Tests pucerons -----	252
c)	Echantillonnage -----	252
B-	Stress abiotiques -----	252
1-	Stress nitrates : Tests de germination in vitro-----	252
2-	Forte lumière, forte température-----	253
3-	Stress hydrique -----	253
a)	Mise en place du stress hydrique -----	253
b)	Mesure de la teneur en eau des plantes -----	253

c)	Mesure du contenu relatif en eau des plantes -----	254
d)	Mesure du potentiel hydrique -----	254
e)	Contenu relatif en eau des pots -----	254
C-	Analyses des échanges gazeux -----	255
VIII.	Mesure d'influx : marquage au ¹⁵ N -----	256
IX.	Techniques d'Imagerie -----	257
A-	Observations en fond clair ou contraste interférentiel -----	257
B-	Microscopie confocale à balayage laser -----	257
X.	Analyse du niveau de ploïdie par cytométrie en flux -----	257
XI.	Paramètres de croissance -----	258
A-	Cinétique de développement -----	258
B-	Détermination du ratio partie aérienne / partie racinaire -----	258
C-	Détermination MF/MS -----	258
D-	Quantification du nombre de siliques -----	258
E-	Remplissage des siliques -----	258
F-	Quantification du rendement en graines -----	259
XII.	Analyses <i>in silico</i> -----	259
A-	Les sites de bases de données génomiques et protéomiques -----	259
B-	Genevestigator -----	260
C-	MeV -----	260
D-	Brenda -----	260
E-	Image J -----	260
	Bibliographie -----	261
	Annexes -----	314

Préambule

Préambule

Le monde vivant évolue souvent vers plus de complexité. Des premiers précurseurs de biomolécules autoreproductibles aux interactions avancées des cellules eucaryotes, l'évolution a permis d'ajuster le vivant aux obstacles rencontrés. Il n'en demeure pas moins fascinant de constater que certains grands principes ont prouvé une exceptionnelle utilité, et ont enduré les périodes d'évolution pour se retrouver aujourd'hui universels pour tous les organismes. Ces principes incluent un ensemble de petites molécules cofacteurs porteuses de fonctions vitales dans les voies métaboliques et les processus régulateurs. Parmi ces petites molécules si essentielles à la vie, l'une d'entre-elles, le nicotinamide adénine dinucléotide ou NAD, ne cesse d'intriguer les scientifiques.

Cette molécule de 664 daltons (Da) fut découverte chez la levure il y a plus d'un siècle par Sir Arthur Harden et William John Young en 1906 (Harden & Young, 1906) qui la nommèrent « Cozymase » pour ses propriétés stimulatrices de la fermentation alcoolique. Une découverte qui, associée 15 ans plus tard à la détermination de la structure dinucléotidique de la « cozymase » par Hans Karl August Simon von Euler-Chelpin, valut à ces auteurs le prix Nobel de chimie en 1929 (von Euler, 1930). Et la série des prix Nobel associée à cette molécule ne s'arrêta pas là puisqu'en 1931 Otto Warburg obtint le prix Nobel de Physiologie ou Médecine pour ses travaux sur « l'enzyme respiratoire » (Warburg & Christian, 1936), et Arthur Kornberg qui fut prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1959 pour avoir isolé l'ADN-polymérase I, dirigeait la section « Enzyme et Métabolisme » du National Health Institute où il fut le premier à découvrir une étape de la biosynthèse du NAD (Kornberg, 1948). En 1949 Morris Friedkin et Albert Lester Lehninger mirent en évidence que le NADH liait la phosphorylation oxydative et le cycle des acides tricarboxyliques (Friedkin & Lehninger, 1949) et en 1958 Jack Preiss et Philip Handler décrivent trois enzymes et deux intermédiaires stables impliqués dans la synthèse du NAD à partir de l'acide nicotinique (Preiss & Handler 1958a; Preiss & Handler 1958b). En leur honneur cette voie de biosynthèse est communément appelée voie de Preiss-Handler.

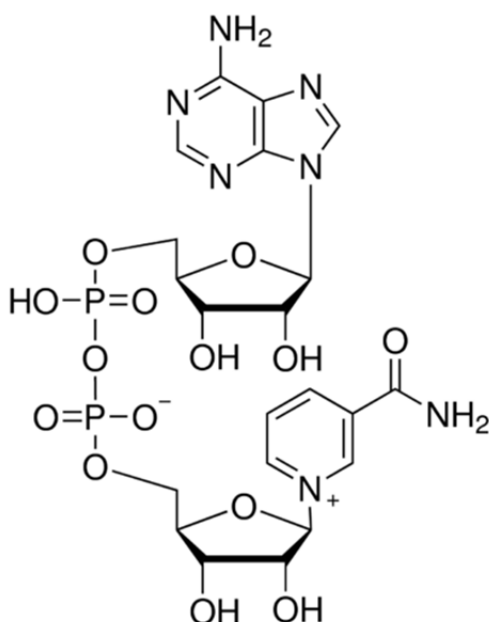
Le NAD n'a pas fini de nous surprendre puisque des découvertes récentes lui suggèrent d'autres rôles importants différents de ceux liés à ses propriétés oxydoréductrices, l'impliquant notamment dans la signalisation cellulaire. Ces fonctions incluent le clivage de la molécule, la synthèse de l'ADP-ribose cyclique, la désacétylation de protéines, et la formation de polymères d'ADP-ribose, mécanisme important dans la réparation de l'ADN (Hunt et al., 2004; Vanderauwera et al., 2007; Wang & Pichersky, 2007).

Enfin, mon directeur de thèse reste convaincu que le NAD vient de l'espace, arguant de la présence de nucléotides dans des météorites ainsi que la détection récente de son précurseur biosynthétique, l'aspartate, au sein des comètes. L'histoire nous dira si cela lui vaudra aussi un futur prix Nobel... En attendant, le NAD présent sur terre a encore bien des secrets à nous révéler, en particulier au sein des plantes, comme vous pourrez le constater en lisant les travaux de cette thèse.

Introduction

Introduction

I- Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide



Toutes les cellules vivantes utilisent le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) comme cofacteur pour réaliser leurs transferts énergétiques. Le NAD est un nucléotide à pyridine qui participe au transport d'électrons lors de réactions de réduction-oxydation (rédox) et à la signalisation cellulaire (Hunt et al., 2004; Noctor et al., 2006; Pétriacq et al., 2013). Ce nucléotide à pyridine est composé de deux nucléotides reliés par un groupement diphosphate. Un des nucléotides contient une molécule d'adénine et l'autre une molécule de nicotinamide, porteuse d'un noyau pyridine (**Figure 1**).

Figure 1. Structure du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Le NAD est constitué d'une adénosine et d'un ribosyl-nicotinamide reliés par un pont diphosphate. Source www.sigma-aldrich.com

Le NAD existe sous deux formes: NAD^+ qui constitue la forme oxydée et NADH celle réduite. Le NAD existe aussi sous forme phosphorylée au niveau du 2'hydroxyle du ribose portant l'adénine. Le terme NAD utilisé dans cette thèse désigne le couple NAD^+/NADH (Pollak et al., 2007a) et le terme NADP le couple $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ sans distinction entre formes oxydées et réduites. Ces couples possèdent les mêmes potentiels de réduction-oxydation, communément appelés rédox (Schafer & Buettner, 2001). Au sein des cellules, le NADP est davantage impliqué dans les processus de biosynthèse tels que la photosynthèse et la synthèse des acides gras où il agit comme réducteur, alors que le NAD est plus souvent impliqué dans les processus cataboliques où il agit comme oxydant.

A- Les propriétés physico-chimiques du NAD

Dans le métabolisme, le NAD est capable d'accepter ou de donner des électrons dans des réactions rédox. Le transfert d'électron s'effectue sur le noyau nicotinamide de la molécule. Par un apport de deux électrons et d'un hydrure d'hydrogène ($2 e^- + H^+$) en position C-4 du nicotinamide, le NAD^+ est alors réduit en NADH (**Figure 2A**).

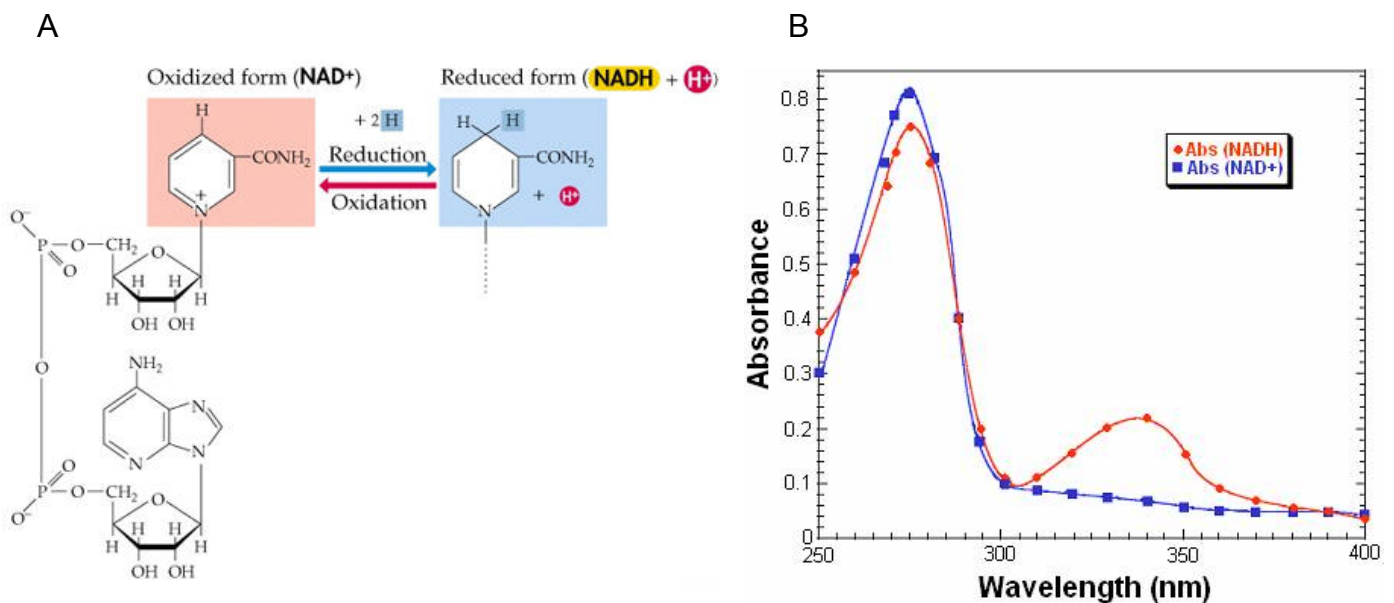


Figure 2. Réaction d'oxydo-réduction du NAD (A) et son effet sur le spectre d'absorption dans l'UV (B). A- Le NAD^+ est réduit en NADH et de façon réversible le NADH est oxydé en NAD^+ . B- Le NADH absorbe dans l'UV à 340 nm alors que le NAD^+ absorbe moins à cette longueur d'onde. Source www.sigma-aldrich.com

Dans la cellule, le NAD^+ se comporte en agent d'oxydation et le NADH en agent de réduction. Le potentiel rédox standard du couple, mesuré en référence à une électrode normale à hydrogène, est de $E^\circ = -320$ mV à pH 7. Le rapport $NAD^+/NADH$ définit l'équilibre entre formes oxydée et réduite. Ce rapport est une composante importante de ce qui est communément nommé « état rédox » de la cellule et reflète l'équilibre oxydoréducteur cellulaire des thiols (molécules à groupement SH) et les nucléotides à pyridine (NAD et NADP). La mesure de ce rapport permet de mesurer l'activité métabolique ainsi que la « bonne santé » de la

cellule. En effet, une oxydation cellulaire, encore appelée stress oxydatif est souvent associée à des processus de mort cellulaire (Schafer & Buettner, 2001). En général, ce rapport est constant pour un compartiment cellulaire donné et dans les cellules vivant en conditions aérobies, le rapport NAD^+/NADH oscille entre 8 et 10. Le potentiel d'oxydoréduction qui en résulte est alors plus élevé, soit E° égal à -250 à -290 mV en référence à une électrode normale à hydrogène (Schafer & Buettner, 2001).

Grâce à leur composante adénine, les molécules de NAD^+ et de NADH absorbent fortement dans les UV, ce qui en facilite la détection et la quantification. Le NAD^+ possède un maximum d'absorbance à 260 nm avec un coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{260\text{nm}} = 16900 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Le NADH absorbe en plus à 340 nm avec un coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{340\text{nm}} = 6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (**Figure 2B**). Cette différence d'absorbance des deux formes dans l'UV permet de les quantifier facilement lors de tests enzymatiques (Dawson et al. 1987).

B- Les voies de synthèse du NAD chez les plantes

L'étude des voies de biosynthèse du NAD chez les plantes s'est développée dans les années soixante. Les équipes impliquées travaillaient sur la synthèse de métabolites secondaires dérivés des nucléotides à pyridines que sont la nicotine, la ricinine, la trigonelline en procédant à des marquages pour identifier les voies métaboliques et leurs intermédiaires (Waller et al., 1966; Frost et al., 1967; Ryrie & Scott, 1969; Mann & Byerrum, 1974; Wagner et al., 1986a). Il s'agissait surtout d'études utilisant des molécules enrichies en carbone 14 (^{14}C) et qui se poursuivent jusqu'à aujourd'hui sur de nouvelles espèces de plantes produisant notamment des dérivés glucosides de l'acide nicotinique (Katahira & Ashihara, 2009; Ashihara et al., 2010; Ashihara & Deng, 2012). Pendant longtemps, la seule fonction connue du NAD était son rôle rédox, mais depuis la découverte de l'implication du NAD dans plusieurs réactions de signalisation cellulaire, un effort considérable a été fourni afin d'acquérir une meilleure connaissance des voies de biosynthèse et leur régulation (Noctor et al., 2006; Hunt & Gray, 2009; Pétriacq et al., 2013). Ces progrès ont également été permis par l'annotation récente des gènes de plantes basée sur des

homologies de séquences géniques d'autres organismes (Kato & Hashimoto, 2004; Noctor et al., 2006; Hunt & Gray, 2009). Ces efforts se sont poursuivis avec des études de génétique inverse (Kato et al., 2006; Takahashi et al., 2006; Hashida et al., 2007; Wang & Pichersky, 2007; Schippers et al., 2008; Macho et al., 2012; Pétriacq et al., 2012). Ces informations mises ensemble ouvrent de nouvelles possibilités pour la compréhension de la synthèse de NAD et sa régulation. Elles permettent en outre d'envisager des approches ciblées de dérégulation du métabolisme des nucléotides à pyridine.

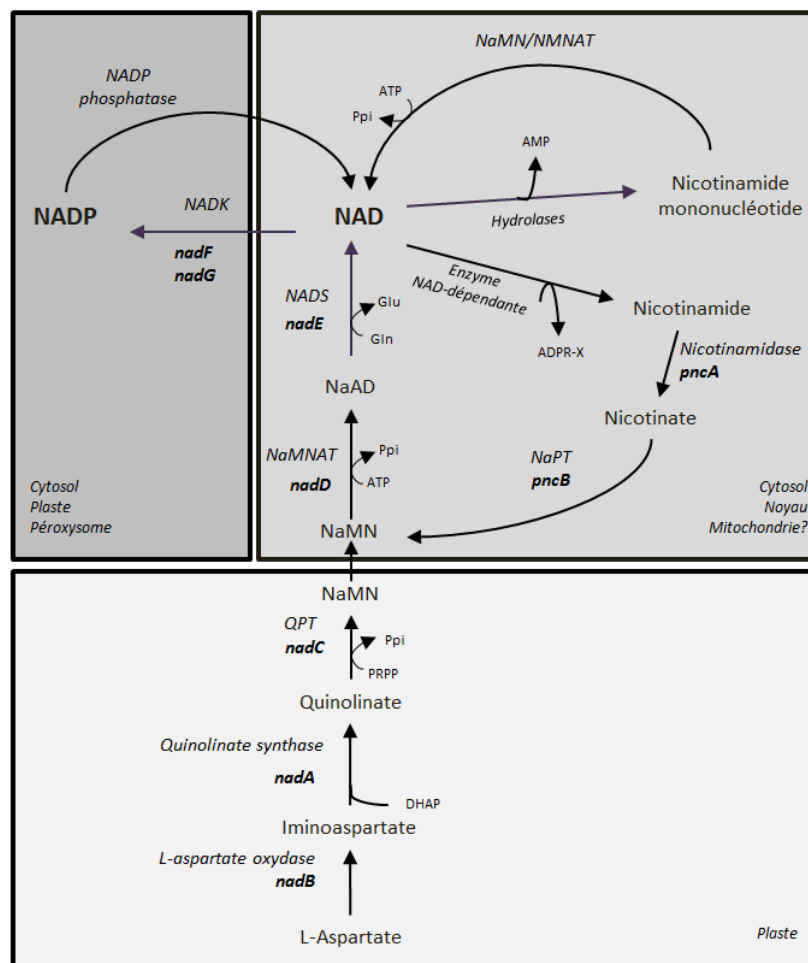


Figure 3. Voies métaboliques de biosynthèse et de recyclage du NAD chez les plantes. ADPR-X, ADP-ribose ou dérivés ; DHAP, dihydroxyacétone phosphate; NaAD, nicotinate adénine dinucléotide; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; NADK, NAD kinase; NADS, NAD synthétase; NaMN/NMNAT, nicotinate mononucléotide/nicotinamide mononucléotide adényltransférase; NaPT, nicotinate phosphoribosyltransférase; PRPP, 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; Ppi, pyrophosphate; QPT, quinolinolate phosphoribosyltransférase. Les noms des gènes bactériens des enzymes impliquées dans la synthèse du NAD(P) sont également mentionnés en gras.

Il apparaît clairement que les voies de biosynthèse et de recyclage du NAD sont complexes et varient considérablement selon les taxons. On distingue cependant chez tous, deux types de voies métaboliques selon lesquelles la biosynthèse du NAD est réalisée : (i) la voie de biosynthèse dite *de novo* et (ii) les voies dites de recyclage qui permettent de reformer du NAD à partir de ses produits de clivage (**Figure 3**). Les deux étapes terminales de la voie de biosynthèse *de novo* du NAD étant communes à celles d'une des voies de recyclage, nous y distinguerons la synthèse du nicotinate (ou acide nicotinique) mononucléotide ou du nicotinate mononucléotide (NaMN) de celle terminale de NAD.

1) La biosynthèse de novo du NaMN chez les plantes : la quinolinate phosphoribosyltransférase

Il semble que la quasi-totalité des organismes vivant soient capables de produire ce précurseur du NAD à partir de son substrat pyridique, le quinolinate. Selon l'organisme considéré, ce composé dérive de deux acides aminés différents, (i) le L-aspartate chez les végétaux supérieurs et la plupart des bactéries et (ii) le L-tryptophane chez certaines bactéries appartenant par exemple au genre *Pseudomonas* ou *Bacillus* (Kurnasov et al., 2003a; Kurnasov et al., 2003b) et les autres Eucaryotes. Le quinolinate est alors formé *via* une voie aérobie appelée voie des kynurénines (**Figure 4**). Une séquence réactionnelle en cinq étapes enzymatiques, suivie d'une cyclisation spontanée permettent la production de l'acide quinolinique (Kurnasov et al., 2003a; Kurnasov et al., 2003b).

Il existe cependant chez les plantes d'anciens résultats suggérant une potentielle synthèse de NAD à partir du tryptophane chez le tabac et le maïs (Henderson et al., 1959; Arditti & Tarr, 1979; Tarr & Arditti, 1982) mais les données issues de la génomique n'ont pas permis de mettre en évidence une voie complète de synthèse de quinolinate à partir du L-tryptophane chez ces espèces.

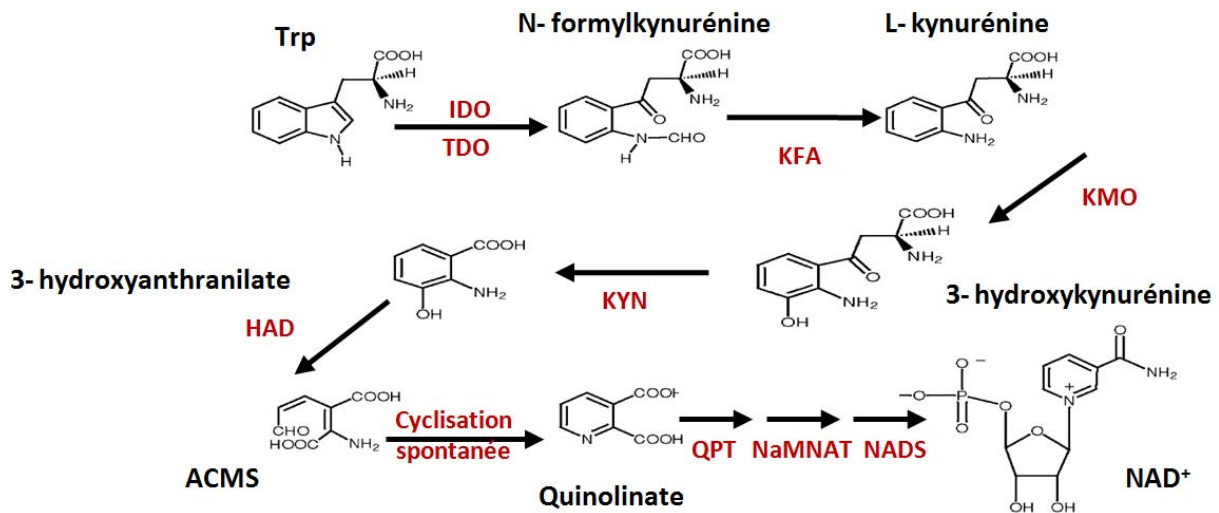
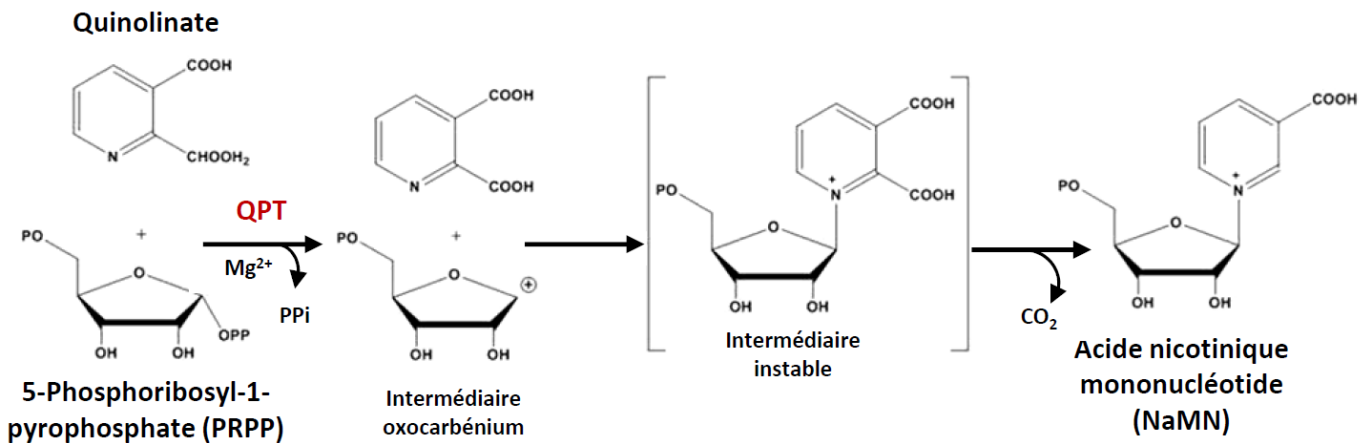


Figure 4. Formation du quinolinate chez les Eucaryotes et certains Procaryotes à partir du L-tryptophane. ACMS, acide 2-amino-3-carboxymuconique-6-semi-aldéhyde ; HAD, 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase; IDO, indoléamine 2,3-dioxygénase; KFA, kynurénine formamidase ; KMO, 3-monooxygénase ; KYN, kynuréninase ; QPT, quinolinate phosphoribosyltransférase ; TDO, tryptophane 2,3-dioxygénase ; Trp, L-tryptophane.

Le NaMN est produit par la quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT, EC 2.4.2.19) qui est commune à la voie de biosynthèse *de novo* des Eucaryotes et des Procaryotes (Foster et al., 1985; Bhatia & Calvo, 1996). La QPT catalyse la conversion du quinolinate en NaMN par transfert irréversible d'un groupement phosphoribosyl du phosphoribosyl-pyrophosphate (PRPP ; **Figure 5**), qui provient du ribulose-5-phosphate issu de la voie des pentoses phosphates. Cette voie métabolique partage comme substrat avec la glycolyse le glucose-6-phosphate et génère, outre du ribulose-5-phosphate, du NADPH (**Figure 5**). La réaction catalysée par la QPT nécessite la présence d'ions bivalents Mg^{2+} et libère du dioxyde de carbone (CO_2) et du pyrophosphate inorganique (PPi). La caractérisation de l'enzyme purifiée d'albumen de ricin a permis de mesurer des valeurs de K_m pour le quinolinate et pour le phosphoribosyl-pyrophosphate de 12 et 45 μM respectivement (Mann & Byerrum, 1974).



Un gène unique homologue du gène bactérien *nadC* code la QPT chez les plantes (*At2g01350* chez *Arabidopsis thaliana* ; Noctor et al., 2006), à l'exception du tabac, où une seconde isoforme serait impliquée dans la production de nicotine (Ryan et al., 2012). Son interruption par une insertion d'un ADN de transfert (ADN-T) est rapportée létale à l'état homozygote chez *Arabidopsis thaliana* (Kato et al., 2006). Des approches de bioinformatique prédisent un adressage de l'enzyme dans les mitochondries et le cytosol chez *Arabidopsis thaliana* et le tabac mais des études *in vivo* ont montré la présence de la protéine dans le chloroplaste (Sinclair et al., 2000; Kato et al., 2006).

Un système inductible d'enrichissement en NAD en surproduisant la quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT) d'*Escherichia coli* chez *Arabidopsis thaliana* a permis de mettre en évidence l'implication du NAD dans les mécanismes spécifiques de défenses qui régissent les interactions plantes-pathogènes (Pétriaccq et al., 2012; Pétriaccq et al., 2013). Par ailleurs, une dérégulation de la synthèse de NAD par l'étape enzymatique catalysée par la QPT endogène d'*Arabidopsis thaliana* souligne le rôle critique du NAD dans la balance carbone/azote (C/N) des plantes, en particulier en modifiant l'assimilation de l'azote en conditions photorespiratoires (Pétriaccq, 2011).

2) La biosynthèse du quinolinate chez les plantes : la L-aspartate oxydase et la quinolinate synthase

La biosynthèse du NAD *de novo* chez les plantes et la plupart des Procaryotes est réalisée à partir du L-aspartate (**Figures 3 et 6**).

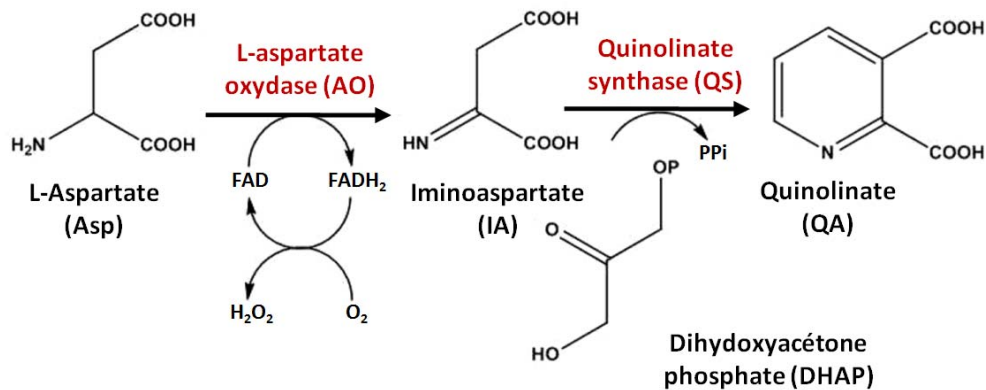


Figure 6. Formation du quinolinate à partir du L-aspartate chez les plantes et la plupart des bactéries. La synthèse de quinolinate est réalisée en deux étapes successives catalysées par la L-aspartate oxydase (AO) et la quinolinate synthase (QS). FAD, flavine adénine dinucléotide.

La conversion du L-aspartate en quinolinate se fait en deux étapes : (i) premièrement l'oxydation du L-aspartate en un intermédiaire instable l'iminoaspartate, suivie de (ii) la condensation de ce dernier avec un intermédiaire de la glycolyse, le dihydroxyacétone phosphate (DHAP), conduisant à la formation de l'acide pyridine-2,3-dicarboxylique ou quinolinate (QA). La première étape est catalysée par la L-aspartate oxydase et la seconde par la quinolinate synthase.

a- La L-aspartate oxydase

La L-aspartate oxydase (AO, EC 1.4.3.16) est une flavoprotéine à Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) liée de façon non covalente à la protéine. Elle catalyse l'oxydation dépendante du FAD, permettant ainsi l'oxydation du L-aspartate en iminoaspartate (**Figure 6**). Chez *Arabidopsis thaliana*, elle est codée par un gène unique (*At5g14760* ; Kato et al., 2006; Noctor et al., 2006), homologue du gène bactérien *nadB*. Chez les bactéries, l'AO, parfois aussi appelée quinolinate synthase B, est capable d'utiliser soit l'oxygène, soit le fumarate comme accepteur d'électrons selon les conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose dans lesquelles elles se trouvent (Nasu et al., 1982).

Toutes les protéines de plantes et de bactéries contiennent deux larges domaines fonctionnels, (i) un domaine L-aspartate oxydase positionné dans les deux tiers N-terminaux de la protéine, et (ii) un domaine succinate déshydrogénase en C-terminal de la protéine (Mattevi et al., 1999; Noctor et al., 2006). Chez les plantes l'enzyme a été très peu étudiée jusqu'ici. Une étude rapporte cependant que l'enzyme purifiée de coton contiendrait un cofacteur de masse moléculaire apparente de 1050 Da (Hosokawa et al., 1983) qui pourrait s'apparenter au FAD bien que la masse de ce dernier soit plus faible. La cristallisation de l'enzyme bactérienne combinée à des expériences de mutagenèse dirigée a permis l'identification des acides aminés impliqués dans la fixation de l'aspartate, du FAD et du fumarate à l'enzyme (Mattevi et al., 1999; Tedeschi et al., 2001; Bossi et al., 2002; Rizzi & Schindelin, 2002). Or, il s'avère que ces acides aminés sont strictement conservés entre toutes les enzymes de plantes et de bactéries, suggérant une forte conservation des propriétés catalytiques entre les bactéries et les plantes (Noctor et al., 2006).

Lorsque le FAD, cofacteur de l'AO, se lie à l'enzyme, un changement de conformation de l'enzyme est observé. Ceci permettrait de protéger l'iminoaspartate, produit instable de la réaction, de la dégradation (Rizzi & Schindelin, 2002). En effet, le temps de demi-vie de l'iminoaspartate en solution est estimé à 144 secondes à pH 8 à 37°C (Nasu et al., 1982). Cependant, l'iminoaspartate serait lui-même inhibiteur de la réaction catalysée par la L-aspartate oxydase et cette inhibition serait suspendue par l'ajout de quinolinate synthase dans le milieu réactionnel (Mortarino et al., 1996) qui prendrait en charge l'iminoaspartate. Ajouté à cela, il a été longtemps suggéré que ces deux enzymes pouvaient former un complexe permettant de transférer l'iminoaspartate instable de la première enzyme vers la seconde. En effet, en voulant purifier l'AO, Griffith et ses collaborateurs, en 1975, avaient obtenu une co-purification de l'AO et de la QS chez les bactéries suggérant un complexe entre ces deux enzymes (Griffith et al., 1975). Pour autant, aucune démonstration n'est venue depuis renforcer l'hypothèse d'un complexe enzymatiques AO-QS (Sakuraba et al., 2005).

Certains organismes peuvent oxyder l'aspartate en iminoaspartate en utilisant des enzymes différentes de la L-aspartate oxydase. C'est le cas de l'archée *Thermogata maritima* dont le gène *nadB* code une aspartate déshydrogénase (EC 1.4.1.-) dépendante du NAD dont la séquence protéique primaire diffère fortement de celle de la L-aspartate oxydase (Yang et al., 2003). Les mammifères ont une D-aspartate oxydase (EC 1.4.3.1) qui synthétise de l'iminoaspartate et il a été démontré *in vitro* que cette enzyme pouvait remplacer la L-aspartate oxydase au sein du complexe quinolinate synthase bactérien (Nasu et al., 1982). Le rôle physiologique de cette enzyme de mammifères ne serait pas de produire du NAD mais plutôt de réguler la concentration en D-aspartate, composé présent en abondance dans les tissus neuroendocriniens, en le convertissant en iminoaspartate qui se décomposerait spontanément en oxaloacétate (Wang et al., 2000; Wolosker et al., 2000).

L'analyse *in silico* des séquences de plantes met en évidence l'existence d'un peptide de transit en position N-terminale signant une localisation chloroplastique de l'enzyme (Noctor et al., 2006), laquelle est confirmée expérimentalement par des expériences de fusion de la protéine avec la GFP (pour « green fluorescence protein ») chez *Arabidopsis thaliana* (Katoh et al., 2006). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'interruption du gène unique codant l'AO par une insertion ADN-T est létale à l'état homozygote (Katoh et al., 2006). Les données transcriptomiques disponibles dans les bases de données montrent que le gène codant l'AO est exprimé dans toute la plante sauf dans les cellules épidermiques, plus fortement dans les cellules de garde des stomates, et surtout dans les jeunes boutons floraux (stades 9-11) et les étamines (base de données Arabidopsis eFP Browser, Schmid et al., 2005). Une forte régulation transcriptionnelle de cette étape enzymatique, particulièrement en conditions de stress (base de données Genevestigator, Hruz et al., 2008) est également observée. Des données obtenues au laboratoire montrent aussi une forte induction du gène codant l'AO en réponse à un stress biotique provoqué par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pétriacq et al., 2012; Pétriacq et al., 2013). Plus récemment, l'équipe de Cyril Zipfel a montré en réalisant un crible « flagellin insensitive » que la L-aspartate oxydase jouait un rôle important dans la fermeture des stomates en réponse à une attaque par les bactéries phytopathogènes chez *Arabidopsis thaliana* (Macho et al., 2012).

Chez les bactéries, le NAD, régule sa production par deux mécanismes : (i) l'un transcriptionnel faisant intervenir un facteur de transcription liant le NAD et qui en se dimérisant vient bloquer l'opéron *nad* (Penfound & Foster, 1999), et (ii) l'autre biochimique par une inhibition compétitive sur le site de fixation du FAD de la L-aspartate oxydase. Si jusqu'ici aucun contrôle transcriptionnel de la biosynthèse du NAD par le NAD lui-même n'a été rapporté chez les plantes, il a été montré que le NAD régulerait l'activité de la L-aspartate oxydase puisqu'une inhibition de 50% de l'AO de coton par 1 mM de NAD a été observée (Nasu et al., 1982; Hosokawa et al., 1983). Chez les plantes comme chez les bactéries, la L-aspartate oxydase apparaît comme une enzyme clef de la voie de biosynthèse du NAD.

b- La quinolinate synthase

La quinolinate synthase (QS, EC 2.5.1.72) est chez les bactéries une métalloprotéine à centre fer-soufre [Fe-S], qui est le produit du gène *nadA* et est encore appelée quinolinate synthase A (Cicchillo et al., 2005; Ollagnier-de Choudens et al., 2005; Rousset et al., 2008). Elle catalyse la condensation entre l'iminoaspartate produit de la L-aspartate oxydase et le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) pour former du quinolinate (**Figure 6**).

Chez *Arabidopsis thaliana*, cette cystéine désulfurylase est codée par un gène unique (*At5g50210*, Katoh et al., 2006), de même que pour de nombreuses autres espèces végétales (Noctor et al., 2006). L'alignement des séquences protéiques de plantes et de bactéries indique la présence de résidus amino-acides fortement conservés (Noctor et al., 2006). La structure tridimensionnelle de l'enzyme a été déterminée chez le genre *Pyrococcus*, révélant une architecture triangulaire au sein de laquelle les résidus amino-acides conservés déterminent une structure en « sandwich à trois couches en triple répétitions » (Sakuraba et al., 2005; Soriano et al., 2013). Le forte conservation de ces acides aminés parmi les quinolinate synthases de plante et de bactéries suggère une préservation de cette structure triangulaire unique, avec cependant une extension en C-terminal pour les enzymes de plantes (Noctor et al., 2006).

La QS bactérienne contient un centre [4Fe-4S] sensible à l'oxygène qui l'inactive et est réactivé en anaérobiose (Cicchillo et al., 2005; Ollagnier-de Choudens et al., 2005). Chez les bactéries l'enzyme a une séquence Cys-w-x-Cys-y-z-Cys en région C-terminale caractéristique des centres Fer-Soufre des déshydratases. Ce motif semble impliqué uniquement chez les bactéries dans la sensibilité de l'enzyme à l'oxygène (Gardner & Fridovich, 1991). Le domaine cystéine désulfurylase de la protéine stimule la reconstruction du centre Fer-Soufre nécessaire à l'activité de la protéine (Rousset et al., 2008).

Chez *Arabidopsis thaliana*, la QS est adressée au compartiment plastidial et une mutation insertionnelle par ADN-T est létale à l'état homozygote (Kato et al., 2006). Lorsqu'une autre mutation du gène de la QS affecte le domaine cystéine désulfurylase de l'enzyme, celle-ci n'est pas létale et l'activité maximale de la QS n'est pas modifiée (Schippers et al., 2008). Pour autant, les plantes montrent chez ce mutant *old5* un vieillissement accéléré suggérant que la chute de l'activité cystéine désulfurylase affecte la compétence catalytique de l'enzyme. Cette lésion dans la voie de biosynthèse *de novo* serait compensée par une augmentation des activités des enzymes d'une des voies de recyclage du NAD. Il en résulte une légère augmentation des teneurs en NAD (Schippers et al., 2008).

3) La conversion du NaMN en NAD chez les plantes

La conversion du NaMN en NAD se fait en deux étapes, (i) premièrement l'adénylation du NaMN en nicotinate adénine dinucléotide (NaAD), suivie (ii) de l'amidification du NaAD en NAD (Ashihara et al., 2005; Noctor et al., 2006). La première étape est catalysée par la nicotinate mononucléotide/nicotinamide mononucléotide adényltransférase (NaMN/NMNAT) et la seconde par la NAD synthétase (NADS ; **Figure 3**). Ces étapes enzymatiques sont communes à la voie de biosynthèse *de novo* et l'une des voies de recyclage du NAD.

a- La nicotinate mononucléotide/nicotinamide mononucléotide adényltransférase (NaMN/NMNAT)

La NaMNAT (EC 2.7.7.18) catalyse l'adénylation du NaMN en NaAD et est le produit du gène *nadD* chez les bactéries (**Figure 3**). Cette réaction nécessite l'énergie de l'ATP et consiste en une attaque nucléophile du groupement phosphorylé en 5' du NaMN sur le phosphate en α de l'ATP, facilitée par la liaison d'ions Mg^{2+} (**Figure 7**). Chez *Escherichia coli*, la levure et l'Homme, cette enzyme est capable d'utiliser le NaMN et le nicotinamide mononucléotide (NMN) comme substrats avec une préférence 1000 fois supérieure pour le NaMN, en se basant sur les valeurs de K_{cat}/K_m pour chacun des substrats (Dahmen et al., 1967; Magni et al., 2004; Lau et al., 2010). Chez l'Homme, cette étape enzymatique est l'une des cibles pharmacologiques privilégiées d'agents thérapeutiques anti-infectieux ou utilisés dans le traitement des cellules cancéreuses (Pan et al., 2014).

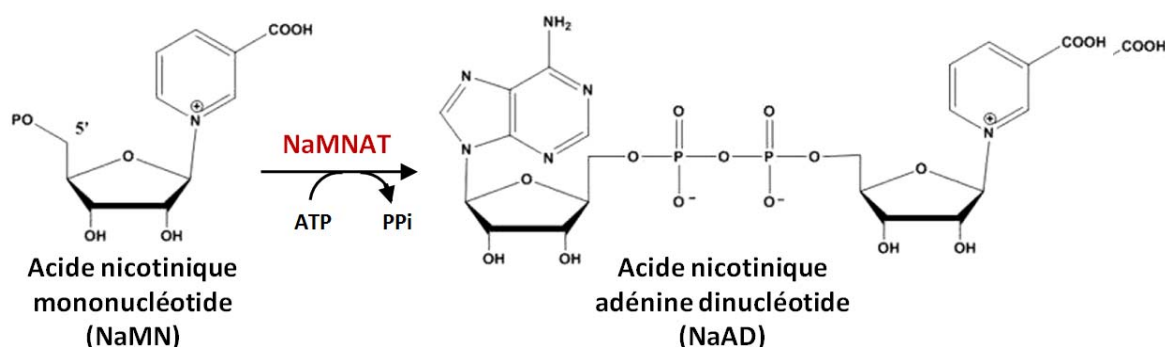


Figure 7. Réaction catalysée par la NaMNAT aboutissant à la formation du NaAD.

Chez les plantes, une activité NMNAT a aussi été détectée dans les racines du tabac et les tubercules de topinambour. L'enzyme purifiée chez le tabac, présente une activité spécifique nettement inférieure en présence de NMN en comparaison de celle mesurée avec le NaMN comme substrat ($0.67 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ pour le NMN contre $3.58 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ pour le NaMN ; Wagner et al., 1986a). Plus récemment, une activité NMNAT a été détectée dans des mitochondries de tubercules de topinambour (Di Martino & Pallotta, 2011). Dans ce cas l'activité de la fraction protéique purifiée de mitochondries utilise préférentiellement le NMN ($3.8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ pour le NMN contre $0.9 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ pour le NaMN ; Di Martino & Pallotta, 2011). Cette activité NMNAT, spécifique de la fraction mitochondriale, joue

certainement un rôle important dans le métabolisme du NAD mitochondrial chez les plantes, probablement dans le recyclage du NMN produit par le catabolisme du NAD dans ce compartiment (**Figure 3**). Chez l'Homme, trois isoformes de NaMNAT sont adressées aux compartiments nucléaire, cytosolique et mitochondrial (Berger et al., 2005) et l'isoforme nucléaire NaMNAT-1 est en fait une NMNAT qui permet le recyclage du NMN produit dans le noyau par le catabolisme du NAD (Zhang et al., 2012).

Chez *Arabidopsis thaliana*, un gène unique (*At5g55810*) code la NaMNAT, et l'analyse des séquences disponibles dans les bases de données n'a pas permis de mettre en évidence un gène spécifique de la NMNAT. Comme chez les bactéries et les autres Eucaryotes, ce gène code probablement pour une enzyme bifonctionnelle NaMN/NMNAT adressée à différents compartiments subcellulaires, Hashida et al. (2006) l'ayant localisée vaguement dans le « cytoplasme » en 2006 (Takahashi et al., 2006). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'interruption du gène codant la NaMNAT est comme pour les trois premières enzymes de la voie de synthèse *de novo* du NAD, létale à l'état homozygote. Cette enzyme semble par conséquent indispensable à la biosynthèse du NAD (Kato et al., 2006). Comme décrit plus loin dans la section intitulée « le rôle du NADPH dans les processus développementaux », des mutants d'*Arabidopsis thaliana* dérégulés dans leur production de NaMNAT sont affectés dans certains processus physiologiques et développementaux, en particulier en situation de stress (Hashida et al., 2007; Hashida et al., 2010; Hashida et al., 2013b; Hashida et al., 2013c).

b- La NAD synthétase

La NAD synthétase (NADS, EC 6.3.5.1) convertit le NaAD en NAD en transformant la fonction acide de la partie nicotinate du NaAD en fonction amide. Le Mg^{2+} est essentiel dans cette activité puisqu'il va activer le groupement phosphate de l'ATP, stabiliser le groupement partant pyrophosphate (PPi) et faciliter l'attaque de l'ammoniac (NH_3 ; **Figure 8** ; Ozment et al., 1999). Chez *Mycobacterium tuberculosis* et *Helicobacter pylori*, il a longtemps été pensé que ces organismes étaient dépourvus de voie de recyclage du NAD. C'est pourquoi la NADS mais aussi la NaMNAT constituent des cibles privilégiées pour la recherche de nouveaux agents

antibactériens (Warren et al., 1983; Boshoff et al., 2008), surtout depuis l'apparition récente de formes résistantes à certains traitements (Rodionova et al., 2014).

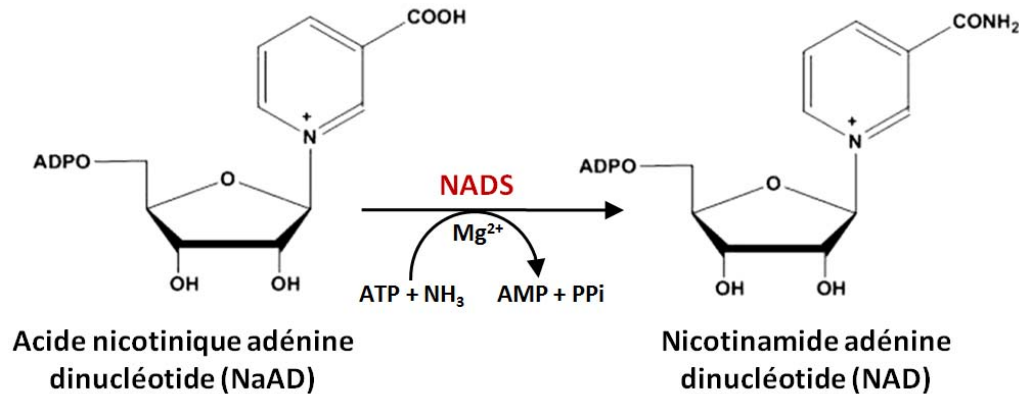


Figure 8. Réaction catalysée par la NAD synthétase (NADS). ADP, adénosine diphosphate ; AMP, adénosine monophosphate ; ATP, adénosine triphosphate ; PPi, pyrophosphate.

La NADS, produit du gène *nadE* chez les bactéries (**Figure 3**), est codée par le gène *At1g55090* chez *Arabidopsis thaliana* et l'absence de peptide d'adressage dans la séquence protéique de l'enzyme indiquerait une localisation cytosolique de celle-ci (Hunt et al., 2004; Katoh et al., 2006; Noctor et al., 2006).

Selon l'espèce considérée, la NADS utilise le NH_3 et/ou un acide aminé donneur d'amine comme substrat. Ainsi, chez *Escherichia coli*, la NADS accepte uniquement le NH_3 comme substrat (K_m pour le NH_4Cl de $65 \mu\text{M}$; Spencer & Preiss, 1967), alors que chez la levure et le rat l'enzyme accepte le NH_4Cl ($K_m = 140 \mu\text{M}$) et la glutamine ($K_m = 35 \mu\text{M}$), même si la glutamine (Gln) serait le substrat physiologique (Preiss & Handler 1958b). L'enzyme de plante accepte préférentiellement la Gln et peut utiliser l'asparagine (Asn), mais pas le NH_3 (Wagner et al., 1986a). L'apparition de la capacité de la protéine à utiliser le Gln comme donneur d'amine résulterait de l'acquisition d'un domaine protéique supplémentaire de type nitrilase en extrémité C-terminale de la protéine (De Ingeniis et al., 2012) que l'on retrouve uniquement chez les Eucaryotes et les cyanobactéries (Gerdes et al., 2006).

4) Interconversion du NAD en NADP

a- La NAD kinase

Le NAD(H) est converti en NADP(H) par phosphorylation ATP-dépendante catalysée par la NAD kinase (NADK, EC 2.7.1.23, **Figure 9** ; Hunt et al., 2004).

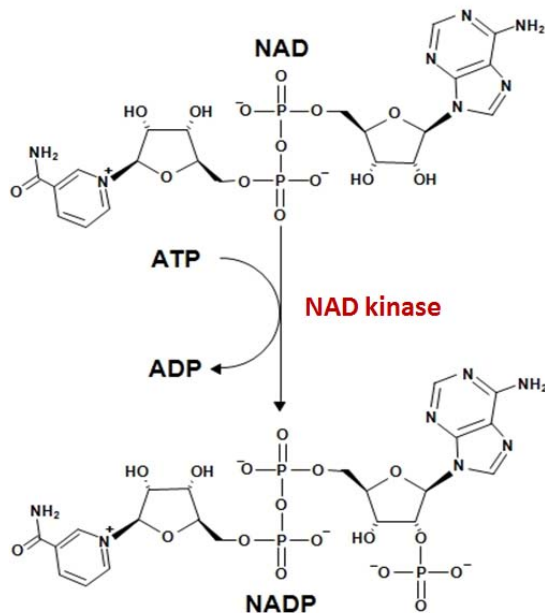


Figure 9. Réaction catalysée par la NAD kinase (NADK). ADP, adénosine diphosphate ; ATP, adénosine triphosphate.

Alors qu'un gène unique code pour les NADK de l'Homme et de la bactérie (*nadF* ; **Figure 3**), trois gènes ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Hunt et al., 2004; Kawai & Murata, 2008; Waller et al., 2010) quatre chez les Monocotylédones et jusqu'à six chez *Brassica rapa* (Li et al., 2014).

Chez de nombreuses espèces, les NADK diffèrent suivant leur dépendance aux calmodulines (CaM ; Cormier et al., 1981; Allan & Trewavas, 1985; Gallais et al., 2000). Chez les végétaux, il existe des isoformes dépendantes ou indépendantes des CaM. Par exemple, l'épinard présente une isoforme cytosolique dépendante aux $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, alors qu'une isoforme chloroplastique est CaM-indépendante. Deux NADK CaM-dépendantes ont été décrites chez l'avoine, l'une dans le cytosol et l'autre mitochondriale. Une troisième isoforme est CaM-indépendante (Gallais et al. 2000). Enfin, chez le maïs, une NAD kinase activée par CaM est localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, et permettrait une réponse aux changements des niveaux calciques cytosoliques (Dieter & Marmé, 1984). Chez *Arabidopsis thaliana*, NADK1 (codée par le gène *At3g21070*) est localisée dans le cytosol, principalement dans les racines, NADK3 (codée par le gène *At1g78590*) est fortement exprimée dans les peroxyosomes foliaires périvasculaires ainsi que le pollen, le stigmate, sur le parcours des tubes polliniques et dans les siliques en

développement, et NADK2 (codée par le gène *At1g21640*), seule isoforme pouvant lier la calmoduline, est localisée dans les chloroplastes et les boutons floraux (Waller et al., 2010). L'une des fonctions des NADK chloroplastiques serait, lors de leur activation par la CaM, de modifier les teneurs en NAD et NADP sous l'action de la lumière en stimulant la production de NADP à partir du NAD et augmentant le ratio NADPH/NADP⁺ (Heineke et al., 1991). Il n'existe cependant pas d'isoforme de NADK mitochondriale chez *Arabidopsis thaliana* contrairement aux observations faites chez la levure (Outten & Culotta, 2003). Chez les végétaux, le NADPH mitochondrial proviendrait du transport du NADP dans les mitochondries (Bykova & Møller, 2001) suivi de l'action des activités transhydrogénases qui interconvertissent NADH et NADP pour produire du NAD et du NADPH (Bykova et al., 1999). Chez les plantes, les NADK produisent donc du NADP et du NADPH en réponse à des stimuli environnementaux ou développementaux, et il est possible que, comme chez l'Homme, les niveaux de NADPH soient contrôlés par l'action coordonnée des NADK avec les NADP déshydrogénases productrices de NADPH (Pollak et al., 2007b).

Puisqu'une augmentation de la teneur en Ca²⁺ cytosolique est un facteur commun dans la réponse des cellules végétales à une gamme de stress comme le froid, le stress salin ou l'application d'acide abscissique ou ABA (Sanders et al., 2002), les NADK CaM-dépendantes pourraient être des acteurs précoces de la signalisation calcique induite en conditions de stress (Hunt et al., 2004). Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, la NADK2 jouerait un rôle prépondérant dans la production de NADP(H) foliaire (Chai et al., 2005; Hashida et al., 2009). Il est également possible que la production de NADPH dans les gaines périvasculaires et dans les organes reproducteurs se fasse directement à partir du NADH (Turner et al., 2004) sous l'action de la NADK3, CaM-indépendante, en réponse à une signalisation stress ou développementale similaire à celle observée par Neil Baker et Philip Mullineaux dans leurs travaux sur la signalisation entre formes actives de l'oxygène (ROS pour « Reactive Oxygen Species ») et ABA, induite par la forte lumière (Fryer et al., 2003; Galvez-Valdivieso et al., 2009) dans les tissus périvasculaires.

Etant donné l'importance de la production de NADPH dans la synthèse de ROS nécessaires à certains mécanismes physiologiques comme la fermeture des stomates dépendante de l'ABA ou les réactions de défenses face aux attaques

pathogènes, la modulation des activités NAD(H) kinases représente une étape régulatrice potentielle de la génération des ROS dans ces mécanismes (Hunt et al., 2004; Pétriacq et al., 2013).

A la lumière, la ferrédoxine-NADP réductase (FNR, EC 1.18.1.2) est cependant responsable de la majorité de la production de NADPH dans les chloroplastes et *in extenso* au sein des cellules (Noctor, 2006). Cette enzyme transfère les électrons de la chaîne thylakoïdienne provenant de l'eau à l'accepteur final qu'est le NADP⁺. D'autres enzymes générant le NADPH dans les plantes peuvent cependant être impliquées dans ces mécanismes de gestion des ROS et du pouvoir réducteur. C'est le cas de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH, EC 1.1.1.49) et de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH, EC 1.1.1.44), qui convertissent successivement le glucose-6-phosphate + NADP en 6-phosphogluconate + NADPH, puis le 6-phosphogluconate + NADP en ribulose-5-phosphate + CO₂ + NADPH (Pugin et al., 1997) dans la voie des pentoses phosphates dans le cytosol mais aussi des plastes (Dennis et al., 1997), de la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante (NP-GAPDH, EC 1.2.1.9 convertissant le D-glyceraldéhyde 3-phosphate + NADP⁺ + H₂O en 3-phospho-D-glycérate + NADPH + H⁺; Rius et al., 2008; Piattoni et al., 2013) qui shunte une partie de la glycolyse dans le cytosol, de l'isocitrate déshydrogénase à NADP (ICDH, EC 1.1.1.42, convertissant l'isocitrate et le NADP en α-cétoglutarate + CO₂ + NADPH) (Gálvez et al., 1999) dans la mitochondrie, de la malate déshydrogénase à NADP (MDH, EC 1.1.1.82, convertissant le malate et le NADP en oxaloacétate + NADPH) dans les plastes (Heyno et al., 2014), l'enzyme malique (ME, EC 1.1.1.40, convertissant le malate et le NADP en pyruvate + CO₂ + NADPH) dans le cytosol (Doubnerová & Ryšlavá, 2011), les aldéhyde déshydrogénases (ALDH, EC 1.2.1.3) présentes dans les plastes, les mitochondries et le cytosol (Sunkar et al., 2003; Hou & Bartels, 2014) et l'enzyme bifonctionnelle méthylène tétrahydrofolate déshydrogénase/méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase (MTHD/MTHCH, EC 1.5.1.5, convertissant le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate et le NADP en 10-formyl tétrahydrofolate + NADPH). Cette dernière enzyme, localisée dans le cytosol et la mitochondrie, a été très peu étudiée jusqu'ici chez les plantes, (Cossins et al., 1993; Kirk et al., 1995) (base de données GelMap de l'université de Hannover <https://gelmap.de/howto>)

et est le principal site de production de NADPH dans des cellules animales en prolifération (**Figure 18** ; Fan et al., 2014).

b- La NADP phosphatase (NADPPase)

Le NADP peut être converti en NAD par une activité phosphatase (**Figure 3**). L'activité NADPPase (EC 3.1.3.-) a été détectée dans les mitochondries de foie de rat (Richter, 1987), et chez les bactéries (Reidl et al., 2000; Kawai et al., 2004). Il a été montré que son activité est corrélée au rythme circadien chez l'euglène (Laval-Martin et al., 1990) et à la dormance des semences chez l'avoine. Mais cette enzyme n'a été purifiée que partiellement chez l'avoine (Gallais et al., 2000). En l'absence de séquence protéique connue et de clonage du gène codant pour cette protéine, très peu d'informations sont disponibles aujourd'hui concernant la NADPPase. Cependant, chez les archées, il est suggéré que cette activité serait produite par une protéine bifonctionnelle aux activités NADPPase/NADK avec une activité NADPPase probablement portée par un domaine de type inositol-monophosphatase/fructose bisphosphatase (Kawai & Murata, 2008). Jusqu'ici, aucun numéro de classification enzymatique (EC) n'apparaît pour cette enzyme dans la base de données de référence Brenda (<http://www.brenda-enzymes.org/>) de l'université de Braunschweig (Schomburg et al., 2014).

Chez *Avena sativa*, deux protéines extraites d'embryons de caryopses, de 37 kDa et 160 kDa présentant une activité NADPPase, ont été partiellement purifiées. La protéine de 37 kDa présente une activité 4 fois plus faible que celle de 160 kDa mais est dotée d'une très forte spécificité de substrat pour le NADP⁺ (Gallais et al., 2000). Plus récemment, chez *Arabidopsis thaliana*, il a été mis en évidence une corrélation inverse entre activités NADK et NADPPase associée à une différence de dormance entre les écotypes étudiés (Hunt & Gray, 2009).

II- Le catabolisme du NAD

Au-delà de son rôle dans les mécanismes d'oxydo-réduction, le NAD est catabolisé par des enzymes intervenant dans des processus de signalisation cellulaire (Hunt et al., 2004; Noctor et al., 2006). Ces processus impliquent un clivage de la molécule formée d'un groupement ribose lié à un nicotinamide (**Figure 10**). Le clivage du pont diphosphate qui réunit les deux nucléotides ou du pont β -N-glycosidique de la molécule entre l'ADP-ribose et le nicotinamide libèrent une grande quantité d'énergie.

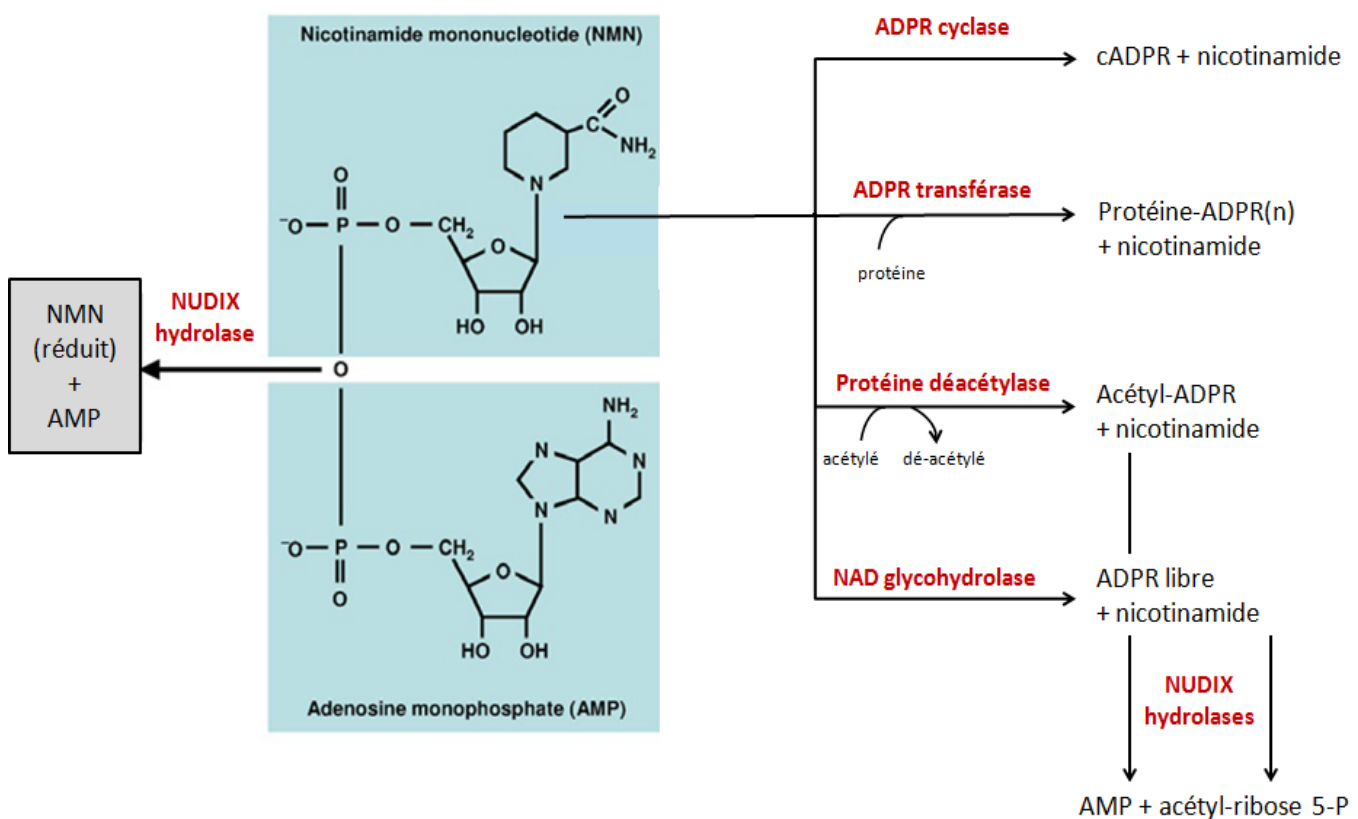


Figure 10. Réactions catalysées par les enzymes du catabolisme du NAD. cADPR, adénosine-5'-diphosphate-ribosyl cyclique; Nudix hydrolase, hydrolase des nucléosides diphosphates reliés à un résidu X pour « Nucleoside Diphosphate linked to X ».

Plusieurs enzymes sont capables de rompre la liaison glycosidique de la molécule du NAD, libérant du nicotinamide et produisant différents composés incluant l'ADP-ribose cyclique (cADPR ou Adénosine-5'-diphosphate-ribosyl cyclique), l'ADP-ribose libre, ou de l'ADP-ribose conjugué à des protéines (**Figure 10**).

A- Utilisation du NAD et du NADP par les adénosine-5'-diphosphate-ribose-cyclases (ADPR cyclases)

La production de cADPR a été très étudiée chez l'aplysie (*Aplysia californica*), un gastéropode marin chez lequel les mécanismes de transmission nerveuse et de signalisation sont bien caractérisés. Le cADPR fait partie des trois molécules, avec l'inositol 1,4,5 tris-phosphate (IP3) et l'acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate (NaADP), capables d'induire une libération de calcium des stocks intracellulaires (Allen et al., 1995). Le cADPR est un second messager à fonctions physiologiques essentielles comme la dépolarisation des neurones chez l'aplysie. L'ADPR cyclase (EC 3.2.2.6) clive la molécule de NAD⁺ et produit du nicotinamide et lie les deux extrémités restantes de la molécule pour produire le cADPR (**Figure 11** ; Lee & Aarhus, 1991).

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'activité de synthèse du cADPR a été détectée dans des extraits protéiques de plantules traités par l'ABA. Cette synthèse utilise le NAD⁺ comme substrat, comme dans les cellules animales (Sánchez et al., 2004; Graeff & Lee, 2013). En effet, si du NAD⁺ radioactif est fourni aux extraits protéiques, du cADPR radiomarqué peut être détecté (Sánchez et al., 2004). Si l'activité de synthèse a été mise en évidence, les acteurs de cette synthèse restent à identifier. Chez les plantes, l'implication du cADPR dans la fermeture des stomates a été mise en évidence par une approche pharmacologique. Des drogues bloquant la synthèse du cADPR ou ses agonistes réduisent la fermeture des stomates déclenchée par l'ABA. De plus, la micro-injection de cADPR mime l'effet de l'ABA (Wu et al., 1997; Leckie et al., 1998). Egalement, après une injection de cADPR dans les stomates, une libération de calcium est observée ce qui provoque une augmentation interne de la concentration calcique. Cette libération calcique par le cADPR a également été mise en évidence par des expériences de patch-clamp sur des vacuoles de betterave (Allen et al., 1995). Le cADPR est donc un acteur des cascades de signalisation chez les plantes. Le cADPR serait également impliqué dans la voie de signalisation des cytokinines chez *Arabidopsis thaliana* (Hwang & Sheen, 2001; Sánchez et al., 2004). Par ailleurs, une ADPR cyclase humaine (CD38 ; Lee, 2012) a été exprimée dans l'apoplaste de plantes d'*Arabidopsis thaliana* pour dégrader le NAD⁺ apoplastique et

démontrer que seul le NAD et non le cADPR ou le NaADP, était impliqué dans les mécanismes de défenses des plantes (Zhang et al., 2012; Pétriacq et al., 2013).

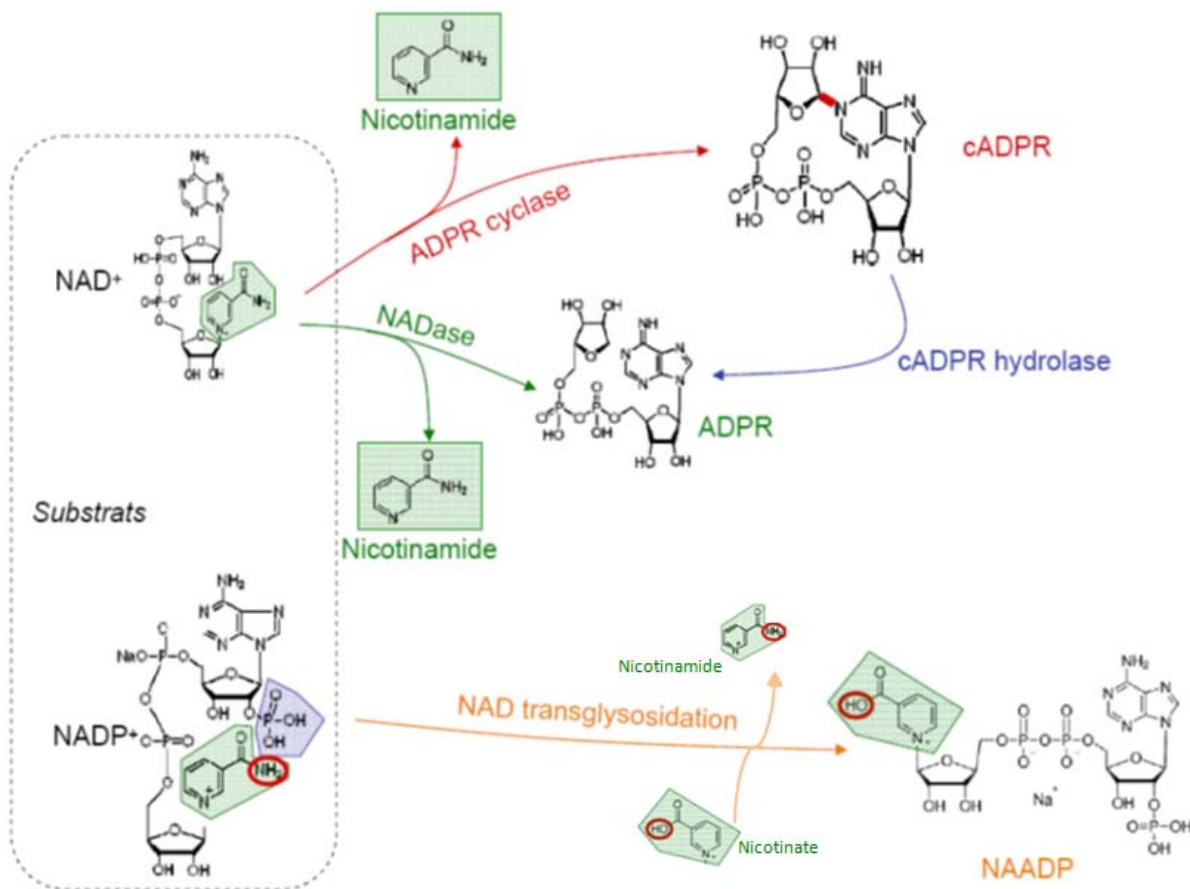


Figure 11. Réactions catalysées par CD38 et CD157. ADPR, adénosine diphosphate ribose cyclique ; cADPR, ADPR cyclique, NAD⁺, Nicotinamide adénine dinucléotide ; NADase, NAD glycohydrolase ; NAADP, Nicotinate adénine dinucléotide phosphate ; NADP⁺, Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate Les ADPR cyclases des mammifères sont capables de catalyser quatre réactions. Elles permettent la synthèse de cADPR et d'ADPR à partir de NAD⁺. La synthèse d'ADPR est très majoritaire. Elles peuvent hydrolyser le cADPR en ADPR. Egalement, ces enzymes peuvent produire du NAADP à partir de NADP⁺. (Schéma de Mathials Brault).

Le NaADP ou nicotinate adénine dinucléotide phosphate, est produit par les ADPR cyclases (EC 3.2.2.5) par déamination du NADP, et est aussi impliqué dans la signalisation calcique chez de nombreux organismes incluant les plantes (Navazio et al., 2000; Navazio et al., 2001; Guse & Lee, 2008), et qui cible un stock de Ca²⁺ distinct de celui ciblé par le cADPR et l'IP3 (Brailoiu et al., 2001). Si la synthèse de

NaADP n'est pas pleinement comprise, il apparaît cependant que la même protéine, l'ADPR cyclase, peut synthétiser le NaADP à partir du NADP par une réaction d'échange de base avec l'acide nicotinique (**Figure 12** ; Chini et al., 2002; Chini & De Toledo, 2002)

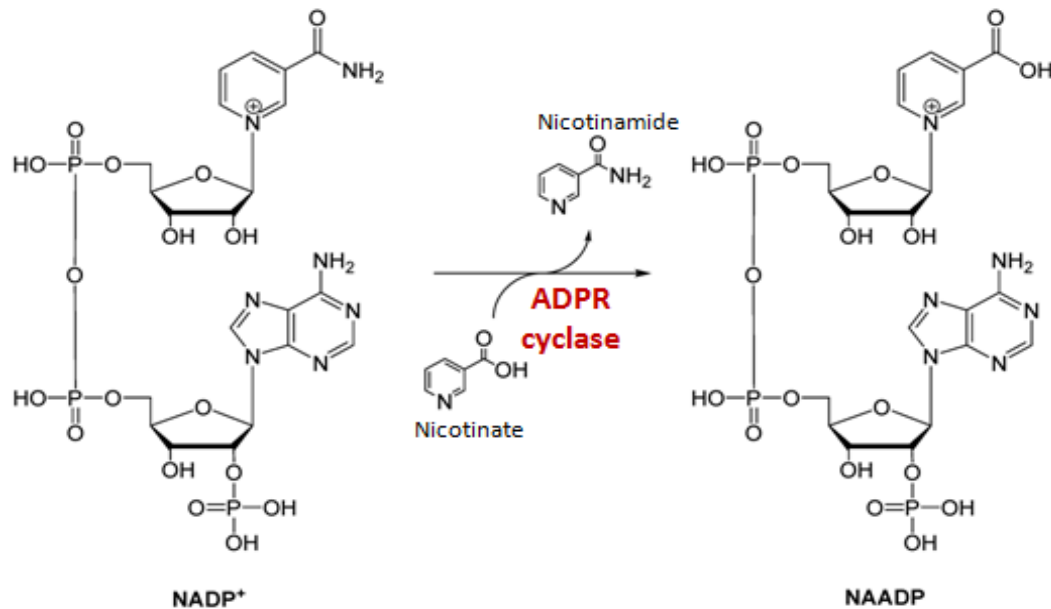


Figure 12. Réaction de transglycosidation catalysée par l'ADPR cyclase à partir du NADP⁺. ADPR cyclase, Adénosine-5'-diphosphate-ribosyl-cyclase ; NADP, Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; NaADP, Nicotinate adénine dinucléotide phosphate.

Chez les mammifères, les ADPR cyclases participent aussi à la production d'ADPR par leurs activités cADPR hydrolase (EC 3.2.2.6, linéarisation du cADPR, **Figure 11** ; Genazzani et al., 1996; Zielinska et al., 2004) et NADase (ou NAD glycohydrolase ; EC 3.2.2.5) qui lui permet de cliver le NAD⁺ en nicotinamide + ADPR (Liu et al., 2009a). Chez les plantes, ces activités sont présumées exister étant donnée l'existence des métabolites produits par ces activités enzymatiques au sein des tissus végétaux (Hunt et al., 2004).

B- Utilisation du NAD par les mono et poly-ADPribose-polymérase (PARP)

L'utilisation majeure du NAD dans ses fonctions non rédox répond à la demande des ADP-ribosyltransférases (ART) et des poly-ADPribose-polymérase encore appelées PARP (EC 2.4.2.30 pour PARP et ART). Ces protéines transfèrent respectivement un ou plusieurs groupements ADP-ribose du NAD à des protéines acceptrices (**Figure 10**). Leur activité est inhibée par le nicotinamide produit lors de la réaction (Hunt et al., 2007). Les PARP sont impliquées dans un grand nombre de processus fondamentaux comme la réparation de l'ADN, les modifications de la chromatine et la décompaction de l'ADN en régulant les motifs de méthylation de l'ADN (Caiafa et al., 2009), la transcription des gènes, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la régulation de la longueur des télomères (Bürkle, 2001; Briggs & Bent, 2011; Lamb et al., 2012; Swindall et al., 2013).

La PARP la mieux caractérisée et représentative de cette famille de protéines enzymatiques est la PARP1 de l'Homme (Swindall et al., 2013) qui est composée de trois domaines : (i) un domaine N-terminal qui agit comme un détecteur des cassures de l'ADN, (ii) un domaine central d'automodification qui est impliqué dans le recrutement d'enzymes associées au mécanisme de réparation par excision de bases, et (iii) le domaine catalytique C-terminal porteur de l'activité catalytique d'ADP-ribosylation (de Murcia & Ménissier de Murcia, 1994). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* code pour au moins trois isoformes de PARP, (i) la PARP2 (homologue de PARP1 de l'Homme codée par *At2g31320*) qui est une PARP dite canonique car contenant les trois domaines structuraux décrits ci-dessus chez la PARP1 de l'Homme, (ii) la PARP3 (homologue de PARP2 de l'Homme codée par *At5g22470*) dépourvue du domaine N-terminal canonique en doigt de zinc détecteur des cassures de l'ADN, et (iii) la PARP1 (homologue de PARP3 de l'Homme codée par *At4g02390*), dépourvue du domaine N-terminal canonique et dont le domaine central contient un domaine SAP de fixation à l'ADN (Briggs & Bent, 2011; Lamb et al., 2012; Bianchi & De Maio, 2014). Les plantes possèdent une autre famille de protéines de type PARP, appelées SRO (pour « similar to rcd one ») ayant un domaine catalytique PARP. On distingue deux types de SRO, l'un présent chez toutes les plantes avec un domaine d'interaction protéine-protéine, et un autre

groupe de SRO appelé RCD (pour « Radical Cell Death » ; Ahlfors et al., 2004) présent uniquement chez les Eudicotylédones (Lamb et al., 2012). Il semble que ce groupe de protéines n'ait pas de capacité à poly-(ADP)-ribosyler des cibles. On leur prêterait plutôt une activité de mono-ADP-ribosylation (Briggs & Bent, 2011).

Lors d'un stress génotoxique, les PARP sont l'un des premiers intervenants aux sites de cassure de l'ADN. Elles vont agir comme détecteur des cassures de l'ADN et comme molécule signal des mécanismes de réparation de l'ADN avec un rôle de guide qui oriente soit vers la réparation soit vers la mort cellulaire programmée, en fonction de la gravité des dommages et de l'amplitude de l'activation de la PARP (Huber et al. 2004). Lorsque les PARP se lient à un brin d'ADN cassé, cela active leur activité catalytique. Le NAD⁺ est alors consommé pour la poly-(ADP)-ribosylation des PARP elles-mêmes ainsi que des facteurs de transcription présents au site de cassure. Ces modifications des facteurs de transcription vont les empêcher de se lier à leur site de fixation sur l'ADN, bloquant la formation de complexes d'initiation de la transcription et prévenant une transcription de l'ADN cassé, et les auto-modifications des PARP vont dissocier les PARP de l'ADN, libérant l'accès des protéines de réparation de l'ADN (Oei et al., 1998; Oei & Ziegler, 2000).

Les PARPs sont impliquées dans les réponses aux stress chez divers organismes, plantes incluses (Doucet-Chabeaud et al., 2001; De Block et al., 2005; Ying et al., 2003; Pellny et al., 2009; Vigani & Zocchi, 2009; Adams-Phillips et al., 2010), ainsi que les SRO dans le maintien de l'homéostasie rédox en conditions de stress (Ahlfors et al., 2004; Liu et al., 2014a). Ces fonctions dérivées du NAD seront décrites plus loin dans le chapitre IV intitulé « Les fonctions du NAD ». Comme décrit précédemment, la poly-(ADP)-ribosylation (parpylation) est une modification post-traductionnelle des protéines qui fixe des groupements ADP-ribose sur des protéines acceptrices. Ces modifications sont réversibles sous l'action des poly-ADP-ribose glycohydrolases (PARG) qui hydrolysent les polymères d'ADP-ribose des protéines. L'ADP-ribose libéré par les PARG ne pouvant s'accumuler, il est ensuite hydrolysé par les NUDIX hydrolases (hydrolases des nucléosides diphosphates reliés à un

résidu X, ou ADP-ribose pyrophosphatases, ou ADP-ribose diphosphatases) en AMP et ribose-5-phosphate (**Figure 13**).

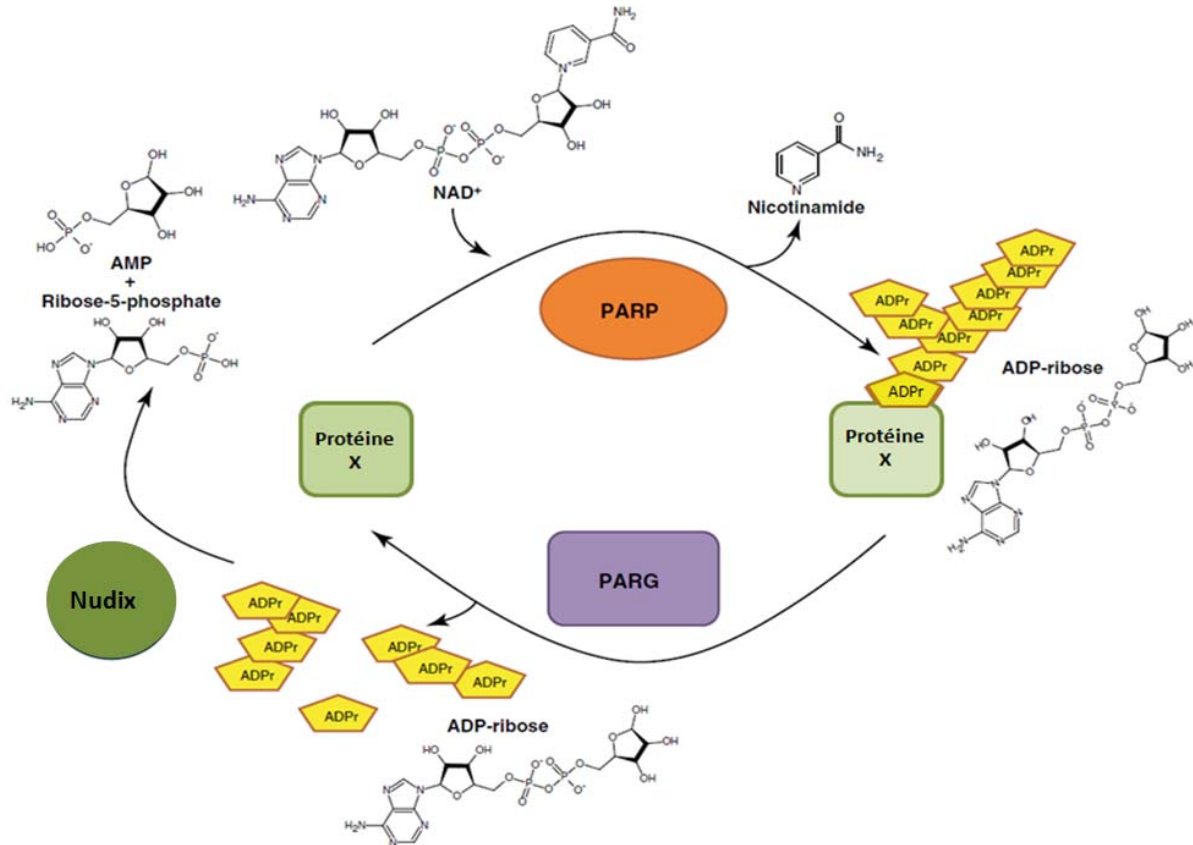


Figure 13. Métabolisme du poly-ADP-ribose par les enzymes poly-ADP-ribose polymérases (PARP), poly-ADP-ribose glycohydrolases (PARG), et les hydrolases des nucléosides diphosphates reliés à un résidu X (Nudix). ADP-ribose, adénosine diphosphate ribose; AMP, adénosine monophosphate. D'après Briggs & Bent, 2011.

C- Réversion de la parpylation par les poly-ADP-ribose glycohydrolases (PARG)

La modification des protéines par parpylation peut être révertée par les poly-ADP-ribose glycohydrolases (PARG ; EC 3.2.1.143) qui catalysent l'hydrolyse de la liaison glycosidique des polymères d'ADP-ribose pour produire de l'ADP-ribose libre. Ces enzymes ont à la fois une activité endo- et exoglycosidique (Davidovic et al., 2001). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient deux gènes PARG adjacents (*At2g31870* et *At2g31865*), issus d'une duplication (Bowers et al., 2003). D'une

manière générale, les plantes contiennent jusqu'à plusieurs gènes de PARP, alors que les animaux n'en contiennent qu'un, mais qui code pour plusieurs isoformes (Briggs & Bent, 2011). Chez les plantes les PARP sont localisées dans le noyau, le cytosol et les mitochondries (Bonicalzi et al., 2005). Les PARP seraient impliquées dans la mort cellulaire et à ce titre dans les réactions de défenses face aux attaques d'agents pathogènes (Adams-Phillips et al., 2008; Adams-Phillips et al., 2010). C'est surtout comme régulateur du rythme circadien qu'elles sont mentionnées chez les plantes, probablement en lien avec les niveaux fluctuants d'UV et les mécanismes de protections qu'ils engendrent via les PARP notamment (Panda et al., 2002; Hunt et al., 2004; Briggs & Bent, 2011). Les PARP réverteraient ou contrebalanceraient l'action des PARP (**Figure 13**).

Chez les animaux, la mort cellulaire engendrée par l'action des PARP, encore appelée « parthanatos », serait due au moins autant à la persistance des polymères de poly-ADP-ribose non liés à des protéines et qui sont connus pour être toxiques pour la cellule, qu'à des niveaux faibles en NAD^+ que les PARP auraient consommées. Les animaux disposent d'une ADP-ribosyl-accepteur hydrolase (EC 3.2.2.19) qui leur permet de dégrader ces polymères d'ADP-ribose non liés en ADP-ribose libre qui peuvent être pris en charge par les Nudix hydrolases, évitant de déclencher le relargage de facteurs induisant l'apoptose (AIF ou « apoptosis induced factors ») par les mitochondries, et donc le déclenchement de la mort cellulaire (Andrabi et al., 2006; Mashimo et al., 2013; Steffen & Pascal, 2013). Chez les plantes, il est probable que cette activité soit portée par l'une des Nudix hydrolases.

D- Utilisation du NAD et ses dérivés par les Nudix hydrolases

Les Nudix hydrolases (hydrolases des nucléosides diphosphates reliés à un résidu X, ou ADP-ribose pyrophosphatases, ou ADP-ribose diphosphatases ; EC 3.6.1.13), sont des enzymes qui clivent le pont pyrophosphate des molécules dérivées de nucléosides diphosphates, incluant les nucléoside di- et triphosphates et leurs formes oxydées, les dinucléosides polyphosphates, dinucléoside polyphosphates, les sucres nucléotidiques, le NADH, le NADPH, le coenzyme A et la coiffe des ARN non méthylés (Kraszewska, 2008; Song et al., 2013). Découvertes à l'origine chez *Escherichia coli* (MutT) comme suppresseur de mutations liées à

l'oxydation du 8-oxo-dGTP (Bessman et al., 1996), les Nudix hydrolases sont une grande famille enzymatique présente chez tous les organismes et qui catalysent, avec une grande variabilité dans leur spécificité de substrat, l'hydrolyse d'un grand nombre de dérivés de nucléosides diphosphates (Kraszewska, 2008). Elles permettent ainsi de contrôler la concentration cellulaire de leurs substrats.

Chez les plantes, les Nudix hydrolases qui clivent le NAD(P)H produisent du nicotinamide et de l'AMP (ou ADP pour le NADPH) (**Figure 10** ; AtNUDT1, 2, 6, 7, 10, 19) (Dobrzanska et al., 2002; Klaus et al., 2005; Ogawa et al., 2005; Olejnik & Kraszewska, 2005; Jambunathan & Mahalingam, 2006; Ge & Xia, 2008; Ogawa et al., 2008; Ishikawa et al., 2010; Jambunathan et al., 2010; Yoshimura et al., 2014); et celles qui métabolisent de l'ADP-ribose libre produisent de l'AMP et du ribose-5-phosphate (**Figure 13** ; AtNUDT2, 6, 7, 10, 14 ; Ogawa et al., 2005; Olejnik & Kraszewska, 2005; Jambunathan & Mahalingam, 2006; Muñoz et al., 2006; Ogawa et al., 2008; Jambunathan et al., 2010). D'autres Nudix hydrolases utilisent le Coenzyme A comme substrat (AtNUDT11, 15 et potentiellement 22 ; Ogawa et al., 2005; Kraszewska, 2008; Ogawa et al., 2008; Kupke et al., 2009), le FAD (AtNUDT23 ; Ogawa et al., 2008), les adénosines phosphates (AtNUDT4, 12, 13, 16, 17, 18, 21, 25, 28, 29, Olejnik & Kraszewska, 2005; Kraszewska, 2008; Ogawa et al., 2008; Szurmak et al., 2008) et des dNTP (AtNUDT1, 27 ; Dobrzanska et al., 2002; Klaus et al., 2005; Ogawa et al., 2005; Yoshimura et al., 2007; Gunawardana et al., 2008).

Les fonctions physiologiques de ces réactions dans le métabolisme du NAD seraient de prévenir l'accumulation du NADH qui peut inhiber le métabolisme oxydatif, ou de l'ADP-ribose qui peut affecter un grand nombre de processus (McLennan, 2006; Briggs & Bent, 2011). L'ADP-ribose est généré par (i) les PARG (**Figure 13**), (ii) les ADPR cyclases (**Figure 11**), (iii) par la déphosphorylation de l'ADP-ribose-1'-phosphate, produit lors de l'épissage NAD-dépendant des ARN de transfert (Shull et al., 2005), et (iv) de la désacétylation des O-acétyl ADP-ribose relargués par le fonctionnement des histones désacétylases NAD-dépendantes de type Sir2 par des ADP-ribosyl-accepteur hydrolases (Moser et al., 1983; Pfister et al., 2001).

E- Utilisation du NAD par les histones désacétylases de type SIRT

L'expression des gènes chez les Eucaryotes est en partie contrôlée par le NAD qui intervient sur les modifications épigénétiques du génome. Outre la parpylation des protéines par les PARP qui régule les motifs de méthylation de l'ADN, le NAD est aussi impliqué dans les processus d'acétylation/désacétylation des histones via les histones désacétylases de type SIRT. Ces histones désacétylases, de type Sir2 (pour « *Silent Information Regulator 2* »), aussi appelées Sirtuines (en abrégé SRT), sont des histones désacétylases (encore appelées HDAC) mais qui utilisent le NAD⁺ comme substrat (Imai et al., 2000). Elles se distinguent des autres HDAC par leur spécificité de substrat, par leurs séquences et structure protéiques (Hollender & Liu, 2008; Ma et al., 2013).

Les Sirtuines (EC 3.5.1.98) ont la capacité de transférer le groupement acétyle situé en position ^εN des lysines acétylées de cibles protéiques, sur le groupement ADP-ribosyl de la molécule de NAD⁺ qui est alors clivée au niveau de la liaison glycosidique de la molécule (**Figure 10**), produisant du nicotinamide et du 2'-O-acétyl-ADP-ribose (**Figure 14A**). Cette réaction contrecarre l'action des histones acétyl-transférases (EC 2.3.1.48 ; **Figure 14B**). En effet, l'acétylation ^εN des résidus lysine des chaînes latérales des protéines est une modification post-traductionnelle réversible rencontrée dans les règnes Procaryotes et Eucaryotes (Sadoul et al., 2011; Xing & Poirier, 2012).

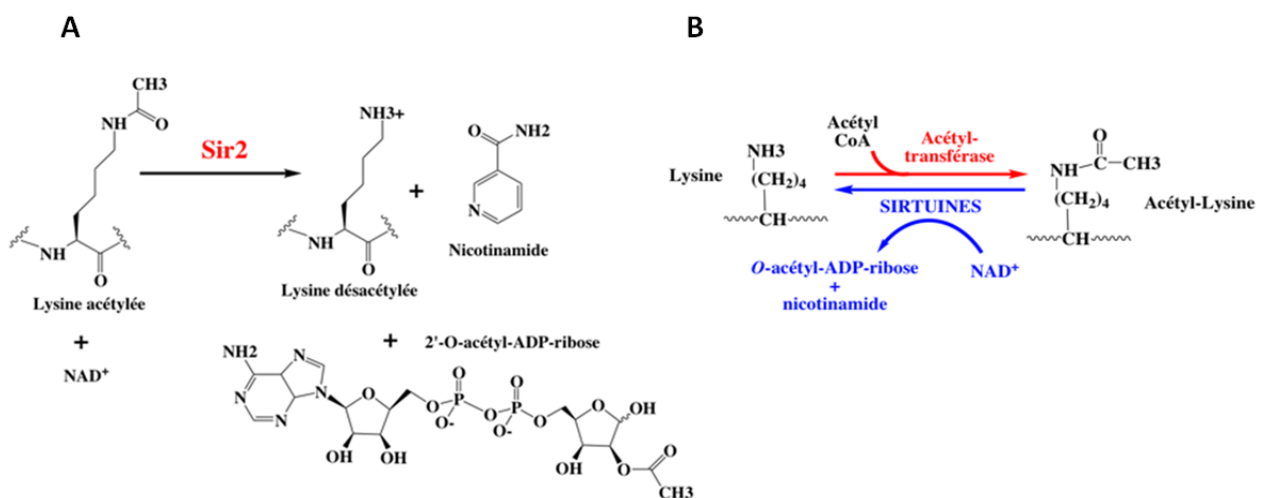


Figure 14. Réaction (A) de ^εN désacétylation catalysée par les Sirtuines et (B) d'acétylation catalysée par les acétyl-transférases.  radical protéique.

La présence de groupements acétyle sur les résidus lysine en ϵN masque les charges positives des sites catalytiques des enzymes et modifie les interactions protéine-protéine et ADN-protéine. Chez les plantes, l'acétylation/désacétylation en ϵN des résidus lysine des histone affecte les mécanismes régulateurs de la transcription et les fonctions chromatinienne (Hollender & Liu, 2008). En effet, l'acétylation des histones a des conséquences sur la structure chromatinienne. Le groupement acétyle ajouté neutralise la charge positive des queues des histones ce qui permet un relâchement des interactions ADN-histones et inter-nucléosomes. Cela rend la chromatine plus flexible et plus accessible aux facteurs de transcription. De manière générale, l'acétylation des histones entraîne une décondensation de la chromatine qui permet l'activation de la transcription. A l'opposé, la désacétylation des histones réprime plutôt la transcription car elle permet à la chromatine de se refermer sur elle-même. C'est ainsi que les Sirtuines ont récemment émergé comme éléments régulateurs de la longévité, de la survie cellulaire, de l'apoptose et du métabolisme dans différents organismes hétérotrophes (Houtkooper et al., 2012; Sauve & Youn, 2012; Sebastián et al., 2012). En effet, il a récemment été mis en évidence que plusieurs protéines intervenant dans le métabolisme primaire étaient acétylées, y compris chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (comme la grande sous-unité de la Rubisco, EC 4.1.1.39, les ATP synthases plastidiales et mitochondriales EC 3.6.3.14) et ces modifications post-traductionnelles entraînent un changement des propriétés biochimiques des enzymes (Finkemeier et al., 2011; Wu et al., 2011). Aussi, chez *Arabidopsis thaliana*, l'histone désacétylase SRT2 interagit au sein du compartiment mitochondrial avec des protéines de la membrane interne telles que l'ATP synthase et les transporteurs d'ATP, et intervient dans le couplage entre respiration mitochondriale et synthèse d'ATP (König et al., 2014).

Sur la base d'analyses phylogéniques, on distingue cinq classes de Sirtuines (I à V), dont toutes ne possèdent pas uniquement une activité ϵN désacétylase. Par exemple dans la classe III certaines SRT de mammifères possèdent une activité additionnelle lysine succinylase et démalonylase (Du et al., 2011). Les SRT les plus étudiées jusqu'ici appartiennent principalement à la classe I (Houtkooper et al., 2012) et à l'inverse celles de la classe II le sont moins. Au sein de ce groupe on retrouve des SIRT ayant une activité additionnelle ADP ribosyltransférase. Par exemple, cette

activité portée par SIRT4 chez les mammifères régule l'activité glutamate déshydrogénase (GDH, EC 1.4.1.4) dans les mitochondries (Haigis et al., 2006). Le génome des plantes ne contient que deux gènes codant pour des Sirtuines. L'un est l'homologue de SIRT6 des mammifères, l'autre de SIRT4 (Huang & Tindall, 2007; Greiss & Gartner, 2009; Hu et al., 2009; Zhong et al., 2013; König et al., 2014). L'homologue de SIRT6, aussi appelée SRT1, est localisée dans le noyau (Huang et al., 2007; Wang et al., 2010), alors que l'homologue de SIRT4, SRT2, est mitochondriale et nucléaire (Chung et al., 2009; Hu et al., 2009; König et al., 2014). Chez les plantes, ces Sirtuines ont aussi un rôle dans la réponse aux stress, la défense face aux agents pathogènes et dans la répression des éléments transposables (Wang et al., 2010; Zhong et al., 2013)

III- Les voies de recyclage du NAD : le cycle des nucléotides à pyridine

Les voies de recyclage permettent de régénérer les pools de NAD utilisés dans les processus de signalisation cellulaire dépendants du dinucléotide et clivant la molécule (**Figures 3 & 10**) qui sont décrits ci-dessus dans la section intitulée « catabolisme du NAD ». Elles permettent aussi de synthétiser les intermédiaires métaboliques précurseurs de métabolites secondaires dérivés du NAD, les alcaloïdes à pyridine. Toutes les espèces végétales disposent d'au moins deux voies de recyclage du NAD : (i) l'une utilisant le nicotinamide mononucléotide qui est régénéré en NAD en une seule étape, (ii) l'autre utilisant le nicotinamide et régénérant le NAD en suivant plusieurs étapes enzymatiques (**Figure 3**).

A- La voie de recyclage directe du nicotinamide mononucléotide en NAD

Le NMN ou nicotinamide mononucléotide, généré par rupture de la liaison diphosphate de la molécule de NAD sous l'action de NAD diphosphatases (EC 3.6.1.22) comme les Nudix hydrolases, peut être reconverti en NAD en une seule étape catalysée par la nicotinamide mononucléotide adényltransférase (NMNAT, EC 2.7.7.1, **Figures 3 & 16**). Chez les plantes, cette activité a été mesurée dans des fractions mitochondriales purifiées de topinambour (*Helianthus tuberosus* L., Di

Martino & Pallotta, 2011). Dans cette étude, les auteurs n'ont pas détecté d'activité NMNAT dans les fractions non mitochondriales de leurs extraits. Les mêmes extraits de protéines partiellement purifiées montrant une activité NMNAT présentent aussi une activité NaMNAT mais avec une moindre affinité pour le NaMN. Pour autant, un seul gène codant pour une NaMNAT/NMNAT (*At5g55810*) apparaît dans les bases de données chez *Arabidopsis thaliana* (Hashida et al., 2007), ce qui suggère que ce gène code pour plusieurs isoformes adressées à des compartiments subcellulaires différents. Les analyses de séquences de la NaMNAT/NMNAT réalisées au laboratoire révèlent en effet l'existence de plusieurs polypeptides potentiels dont l'un pouvant être adressé au compartiment mitochondrial (Jingfang Hao, communication personnelle). Comme décrit précédemment dans le chapitre intitulé « La conversion du NaMN en NAD chez les plantes », la plupart des organismes vivants possèdent des protéines bifonctionnelles porteuses des deux activités NaMNAT et NMNAT (Berger et al., 2004). Cependant, jusqu'ici, aucune activité NMNAT n'ayant été détectée en dehors des fractions mitochondriales chez les plantes, cela pose le problème de la régénération du NMN en NAD dans les autres compartiments subcellulaires. D'autres voies métaboliques décrites plus loin permettent de recycler le NAD à partir du NMN dans ces autres compartiments subcellulaires (**Figure 16**).

Les activités NaMN/NMNAT ont été mesurées par Wagner et al., en 1985 et 1986 (Wagner & Wagner, 1985; Wagner et al., 1986a), qui suggéraient qu'une seule entité enzymatique acceptait les substrats NaMN et NMN. Cependant, lorsque la production de nicotine est induite chez le tabac, ils ont constaté une augmentation différentielle des activités NaMNAT et NMNAT. L'activité NMNAT étant très fortement augmentée, ceci suggère que ces activités sont portées par des polypeptides distincts (Wagner et al., 1986b).

B- La voie de recyclage du nicotinamide produit par les ADPR cyclases, les PARP et les Sirtuines

La voie de recyclage du NAD la plus étudiée chez les bactéries passe par le nicotinamide et le nicotinate. Le nicotinamide, généré par la rupture de liaisons O-glucosidiques de la molécule de NAD (**Figure 10**) sous l'action des ADPR cyclases,

des PARP et des Sirtuines, est recyclé en quatre étapes qui sont conservées dans le règne végétal. Les expériences de marquage menées chez les plantes suggèrent que le nicotinamide relargué par le clivage du NAD est premièrement dé-aminé par la nicotinamidase en nicotinate (Ryrie & Scott, 1969; Ashihara et al., 2005), qui est ensuite converti en NaMN par la nicotinate phosphoribosyltransférase (NaPT ; **Figures 3 et 16**).

1- La nicotinamidase

Le nicotinamide est converti en nicotinate (appelé aussi niacine) par la nicotinamidase (EC 3.5.1.19 ; **Figure 15**). Chez l'enzyme bactérienne (PncA, **Figure 3**), la présence d'une triade catalytique Cys-Lys-Asp retrouvée chez d'autres amidases a été mise en évidence. L'interaction d'un ion Zn^{2+} avec cette triade serait à l'origine du transfert d'un proton et de l'activation du thiolate de la cystéine du site actif pour l'attaque nucléophile sur la liaison amide du nicotinamide, entraînant la libération de NH_3 et la formation du nicotinate (**Figure 15**, Du et al., 2001).

Cette étape enzymatique existe clairement chez les plantes, et l'activité nicotinamidase a été mesurée dans plusieurs espèces végétales (Schippers et al., 2008; Katahira & Ashihara, 2009). Trois gènes d'*Arabidopsis* codent pour des nicotinamidases *At2g22570*, *At5g23230* et *At5g23220* appelées respectivement NIC1, NIC2 et NIC3, et qui présentent de fortes homologies de séquences avec des isochorismatase (EC 3.2.2.1), enzymes qui dégradent l'acide salicylique (Hunt et al., 2004; Wang & Pichersky, 2007) et que l'on retrouve chez certains agents pathogènes pour supprimer les défenses des plantes médiées par l'acide salicylique (Liu et al., 2014b). La nicotinamidase majeure serait NIC1, puisque les mutants d'insertion *nic1* montrent une forte diminution des pools de nucléotides à pyridine démontrant le rôle de la voie de recyclage dans le maintien du pool de NAD chez les plantes. L'expression du gène *NIC1* est également fortement induit en réponse à un traitement à l'ABA (Hunt et al., 2004). Le gène *NIC2* est très fortement exprimé dans les graines et le mutant d'insertion *nic2* a un taux de germination diminué en absence de stratification chez *Arabidopsis thaliana* (Hunt et al., 2004). Cette observation n'est pas liée à l'ABA mais pourrait refléter une inhibition des PARP par le nicotinamide qui s'accumule (Hunt et al., 2007).

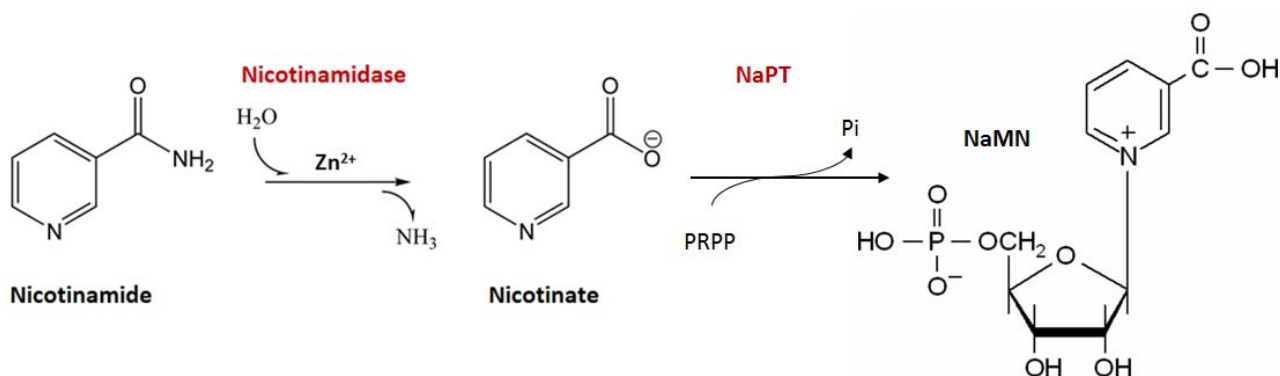


Figure 15 : Réactions catalysées par la nicotinamidase et la nicotinate phosphoribosyltransférase (NaPT). NaMN, nicotinate mononucléotide ; Pi, phosphate inorganique ; PRPP, 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate.

Il est couramment admis que les mammifères sont dépourvus de nicotinamidase (Hunt et al., 2004; Chappie et al., 2005; Noctor et al., 2006; Pollak et al., 2007). Cependant, en 1963, Petrack et al., avaient rapporté l'existence d'une activité nicotinamidase dans des extraits protéiques de foie de rat (Petrack et al., 1963). Mais en 1971, Keller et al., démontrèrent qu'à des concentrations plus physiologiques le nicotinamide n'était pas converti en nicotinate également dans des foies de rats (Keller et al., 1971). Le nicotinamide est par contre directement converti en NaMN par une nicotinamide phosphoribosyltransférase (NaMPT, EC 2.4.2.12), laquelle n'a pas été détectée chez les plantes (Wagner et al., 1986a; Wang & Pichersky, 2007; Katahira & Ashihara, 2009).

2- La nicotinate phosphoribosyltransférase

Le nicotinate est converti en NaMN par la nicotinate phosphoribosyltransférase (NaPT, EC 6.3.4.21, **Figure 15**), produit du gène *PncB* chez les bactéries (**Figure 3**, Sorci et al., 2010). La NaPT transfère le nicotinate sur le PRPP (5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate) pour former le NaMN. La réaction chimique catalysée par cette enzyme est très semblable à la réaction catalysée par la QPT excepté l'étape de décarboxylation.

Deux gènes codent pour cette enzyme chez *Arabidopsis thaliana*, (i) *At4g36940* pour NaPT1 et (ii) *At2g23420* pour NaPT2. Peu d'informations sont disponibles sur les mutants de ces gènes, ce qui ne permet pas de savoir s'ils sont essentiels ou redondants chez les plantes. L'activité NaPT a été mesurée dans les tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (Katahira & Ashihara, 2009) mais aussi chez *Arabidopsis thaliana* (Pétriaccq, 2011). L'augmentation des teneurs en NAD en réponse à un apport exogène de quinolinate est corrélée à une augmentation des niveaux de nicotinate et de l'activité NaPT chez *Arabidopsis thaliana* ce qui montre une stimulation de la voie de recyclage en réponse à une augmentation de la production de NAD (Pétriaccq, 2011). Des expériences de marquage avec du ^{14}C -quinolinate et ^{14}C -nicotinate ont permis de mettre en évidence que les NaPT et la QPT contribuent de façon équivalente à une synthèse de NAD dans les feuilles d'orge (Ryrie & Scott, 1969).

Une augmentation de l'activité NaPT est également observée lorsque la voie de synthèse *de novo* est perturbée en réponse à une mutation qui affecte la compétence catalytique d'une enzyme de la voie de biosynthèse *de novo* (Schippers et al., 2008). Dans ce cas, l'activation de NaPT2 permet de compenser une défaillance dans la synthèse *de novo*, ce qui démontre l'importance de cette enzyme et de la voie de recyclage dans la biosynthèse du NAD chez les plantes (Schippers et al., 2008). Chez les mammifères, l'activité NaPT contribue aussi de façon importante à la production de NAD^+ (Hara et al., 2007).

3- Les enzymes communes à la voie de synthèse *de novo*

Deux enzymes sont communes à la voie de biosynthèse dite *de novo* et celle du recyclage par le nicotinamide et le nicotinate : la NaMNAT et la NADS présentées dans la section intitulée la biosynthèse *de novo* du NAD chez les plantes. Le NaMN est le point de jonction entre ces deux voies métaboliques.

C- Les autres voies de recyclage du NAD connectées au cycle des nucléotides à pyridine

Comme vu précédemment, le cycle des nucléotides à pyridine et la NMNAT permettent de régénérer les pools de NAD utilisés dans les processus de signalisation cellulaire dépendants du dinucléotide et clivant la molécule (**Figure 3**). D'autres processus utilisant des hydrolases génèrent aussi des dérivés du NAD comme le NMN qui sera ensuite recyclé.

Aussi, d'autres voies de biosynthèses utilisent les intermédiaires métaboliques du cycle des nucléotides à pyridine et produisent des formes de stockage de ces nucléotides ainsi que des alcaloïdes à pyridine. C'est le cas de la biosynthèse *de novo* du nicotinate, précurseur de la plupart des alcaloïdes à pyridine.

1- Un recyclage du NAD via le NMN

Selon le schéma décrit en **Figure 10**, les Nudix hydrolases clivent le NAD en NMN et AMP, et le NMN est ensuite recyclé en NAD par une activité NMNAT en une étape. Or, chez les plantes, l'activité NMNAT n'a été détectée que dans le compartiment mitochondrial (Di Martino et al., 2013). D'autres enzymes, que les Nudix hydrolase, de la famille des nucléotides hydrolases (ou nucléotides diphosphatases), sont présentes dans l'ensemble des compartiments subcellulaires. Elles clivent aussi bien le NAD et produisent du NMN dans les cellules (Medda et al., 2000; Moorhead et al., 2003). Le NMN produit, qui n'est pas converti en NAD par la NMNAT, alimente le cycle des nucléotides à pyridine par conversion en nicotinamide (**Figure 16**). Des expériences de marquage du NAD ou des de ses précurseurs au ^{14}C ont montré que toutes les espèces végétales analysées produisaient à la fois du nicotinamide directement et via le NMN (Ashihara et al., 2011). Chez la lentille (*Lens esculenta*), une protéine à activité nucléotide diphosphatase a été purifiée. Celle-ci est capable d'utiliser l'ensemble des nucléotides à pyridine comme substrat, avec une plus forte affinité pour le NADH (Medda et al., 2000).

b- Du NMN au nicotinamide en deux étapes par le NR

Le théier, la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), les Gymnospermes, les pommes de terre et les Fabacées produisent du nicotinamide en deux étapes à partir du NMN. La première étape est catalysée par une 5' nucléosidase qui converti le NMN en nicotinamide riboside (EC 3.1.3.5, **Figure 16**). La seconde étape catalyse la conversion du nicotinamide riboside en nicotinamide par la nicotinamide nucléoside phosphoribohydrolase (numéro EC indéterminé ; **Figure 16**) (Koster et al., 1989; Yin & Ashihara, 2007; Ashihara et al., 2005; Katahira & Ashihara, 2009; Ashihara & Deng, 2012).

c- Du NMN au NaMN en trois étapes

Chez la pomme de terre, il est possible de produire du NaMN à partir du NMN en trois étapes. Après synthèse du nicotinamide riboside, celui-ci est déamidé en nicotinate riboside (NaR) par la nicotinamide riboside déamidase (EC indéterminé; **Figure 16**). Le NaR est ensuite phosphorylé en NaMN par la NaR kinase (EC 2.7.1.173 ; **Figure 16**) (Koster et al., 1989; Katahira & Ashihara, 2009).

2- La synthèse de novo de nicotinate

Le nicotinate est produit chez les plantes selon deux voies principales. La première est la voie des nucléotides à pyridine décrite plus haut faisant intervenir la nicotinamidase après conversion du NAD en nicotinamide. Une seconde voie dite de biosynthèse *de novo* du nicotinate est présente chez toutes les espèces végétales étudiées. Elle consiste en une synthèse du nicotinate en une ou deux étapes à partir du NaMN (**Figure 16**). Cette voie utilise l'excédent de NaMN synthétisé par la voie de synthèse *de novo* du NAD pour synthétiser des molécules de stockage comme le nicotinate, le NaR et les métabolites secondaires dérivés du nicotinate (**Figure 16**).

a- Synthèse de novo de nicotinate en une étape

Le ricin (*Ricinus communis*), le tabac, la pervenche de Madagascar et le Gymnospermes peuvent synthétiser le nicotinate en une seule étape, laquelle est catalysée par une NaMN nucléosidase (EC 3.2.2.14 ; **Figure 16**) (Waller et al., 1966; Mann & Byerrum, 1974; Wagner et al., 1986b; Ashihara et al., 2005).

b- Synthèse *de novo* de nicotinate en deux étapes via le NaR

Le caféier, le théier, les pommes de terre et les Fabacées produisent du nicotinate en deux étapes à partir du NaMN. La première étape est catalysée par une 5' nucléosidase qui converti le NaMN en NaR ou nicotinate riboside (EC 3.2.2.-, **Figure 16**). La seconde étape catalyse la conversion du NaR en nicotinate par la NaR nucléosidase (numéro EC indéterminé) (Koster et al., 1989; Zheng et al., 2004; Zheng et al., 2005; Matsui et al., 2007; Matsui & Ashihara, 2008; Yin et al., 2008; Katahira & Ashihara, 2009; Ashihara & Deng, 2012).

D- La biosynthèse des métabolites secondaires dérivés du nicotinate et du nicotinamide (localisation, transport, remobilisation)

1- Dérivés du nicotinate

a- La nicotine, l'anatabine et l'anabasine

Les Solanacées (tabac, pomme de terre, tomate (*Solanum lycopersicum*)) produisent plusieurs métabolites secondaires dérivés du NAD, certains étant communs à de nombreuses espèces végétales, d'autres étant propres à cette famille. Il s'agit de la nicotine et un autre nicotinoïde mineur qu'est l'anatabine (**Figure 17** ; Wagner Wagner, 1985; Wagner et al., 1986a; Ikemeyer & Barz, 1989). La nicotine (ou (S)-3-(1-méthyl-2-pyrrolidinyl) pyridine) doit son nom au fait que le tabac a été introduit en France en 1560 par Jean Nicot (1530-1604), ambassadeur français au Portugal. Le nicotinate est aussi le précurseur d'un autre alcaloïde chez les Solanacées appelé l'anabasine (**Figure 17** ; Dewey & Xie, 2013). Cet alcaloïde est présent en grandes quantités chez certaines Chénopodiacées comme *Anabasis aphylla* qui a donné son nom à la molécule mais aussi chez *Nicotiana glauca* (Orechoff & Menshikoff, 1931; Saitoh et al., 1985; Sisson & Severson, 1990). La synthèse de l'anabasine peut aussi dériver de la lysine (Dewey & Xie, 2013). Chez le tabac, des expériences de marquage ont permis de montrer que la synthèse de nicotine se fait à partir du quinolinate via la NaMN nucléosidase, c'est-à-dire une des voies de synthèse *de novo* du nicotinate (Wagner et al., 1986a). En effet, de données moléculaires et biochimiques montrent que la QPT permet de maintenir la fourniture en nicotinate nécessaire à la synthèse des dérivés à cycle pyridine comme

les alcaloïdes de défense à pyridine (anabasine, nicotine) (Mann & Byerrum, 1974; Feth et al., 1986; Wagner et al., 1986b; Sinclair et al., 2000; Ryan et al., 2012). Chez *Nicotiana tabacum*, l'activité QPT augmente fortement dans les racines entre 24h et 48 h après blessure (Saunders & Bush, 1979). Cette production est sous contrôle des facteurs de transcriptions Myc2, ERF189 et NIC2 dont l'expression est induite par le jasmonate et l'éthylène (Shoji & Hashimoto, 2011a; Shoji & Hashimoto, 2011b; Shoji & Hashimoto, 2012). De récents résultats indiquent que l'auxine des apex exercerait une signalisation à longue distance sur la production de nicotine (Shi et al., 2006; Li et al., 2007), en plus des effets de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Shoji & Hashimoto, 2014). Chez le tabac, la production de nicotine est dépendante d'une seconde isoforme de QPT formée par duplication (Ryan et al., 2012).

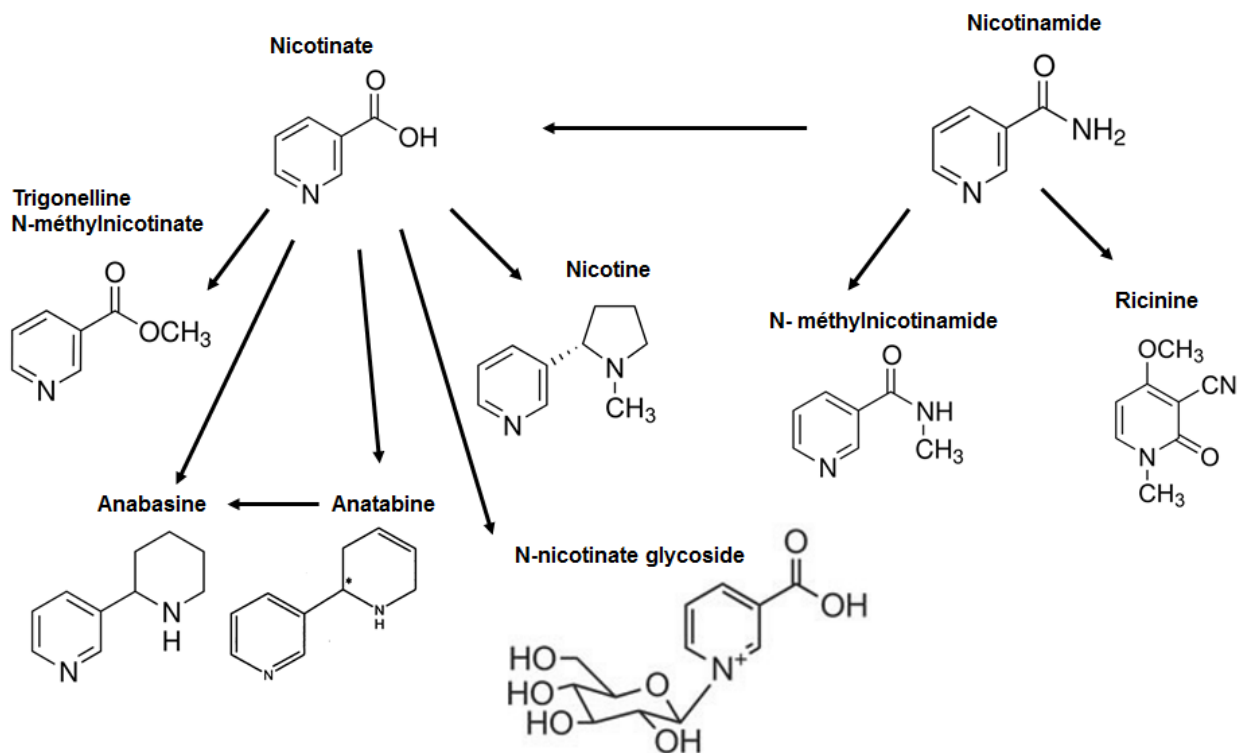


Figure 17 : Les alcaloïdes à pyridine dérivés du nicotinate et du nicotinamide.

b- Le N-méthylnicotinate : la trigonelline

La trigonelline est un zwitterion formé par l'addition d'un groupe méthyle à l'atome d'azote du nicotinate (**Figure 17**). La trigonelline se trouve dans de nombreuses plantes. Elle a été d'abord isolée à partir de graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*, d'où son nom ; Jahns, 1885), mais également de nombreuses espèces d'Angiospermes et de Gymnospermes comme le café, le tabac, le ricin, les pommes de terre, plusieurs espèces de mangroves et les Fabacées. Très présente dans les grains de café vert chez lequel elle contribue jusqu'à 2% du poids frais, la torréfaction en détruit beaucoup mais la saveur amère de la boisson de café est due principalement à la trigonelline (Koster et al., 1989; Waller et al., 1966; Johnson & Waller, 1974; Wagner et al., 1986b; Zheng et al., 2004; Katahira & Ashihara, 2009; Ashihara et al., 2010; Constantin & Delaveau, 2010). La trigonelline est l'alcaloïde à pyridine le plus largement distribué, et retrouvé chez presque toutes les espèces de Fabacées (Matsui et al., 2007; Zheng et al., 2008).

La trigonelline est produite à partir du nicotinate par la nicotinate N-méthyltransférase ou trigonelline synthase (EC 2.1.1.7), en utilisant la S-adénosylméthionine comme donneur de méthyle (Joshi & Handler, 1960; Upmeier et al., 1988; Chen & Wood, 2004). Chez le tabac, et probablement le ricin, des expériences de marquage ont permis de montrer que la trigonelline était synthétisée à partir du nicotinamide de la voie de recyclage du NAD et également à partir du quinolinate via la NaMN nucléosidase, c'est-à-dire une des voies de synthèse *de novo* du nicotinate (Johnson & Waller, 1974; Wagner et al., 1986a). Chez la pomme de terre, le café, le thé et les Fabacées, la synthèse de trigonelline *via* le nicotinate s'effectue par la voie de biosynthèse *de novo* de nicotinate en deux étapes, c'est-à-dire en passant par le NaR (Matsui & Ashihara, 2008; Katahira & Ashihara, 2009; Ashihara et al., 2011; Ashihara & Deng, 2012).

Les propriétés de la trigonelline lui confèrent un rôle dans le blocage des divisions cellulaires en phase G2 du cycle cellulaire (Evans et al., 1979), ce qui a longtemps laissé penser que cette molécule avait un rôle hormonal (Evans & Tramontano, 1981). Mais, on lui attribue surtout un rôle de réserve de nicotinate qui

est utilisé pendant la germination. En effet, la trigonelline déméthylase est induite pendant la germination (Shimizu & Mazzafera, 2000). Chez les Fabacées, la trigonelline serait excrétée par les graines de luzerne et induirait la transcription des gènes de nodulation de *Rhizobium meliloti* en activant la protéine NodD2 (Phillips et al., 1992). D'autres expériences suggèrent que la trigonelline est une source nutritive tout au long de l'association entre *Rhizobium* et Fabacées (Boivin et al., 1990).

c- Le nicotinate glycoside (NaG)

Le nicotinate glycoside ou N- glucosylnicotinate (NaG) est un autre dérivé du nicotinate (**Figure 17**). Ce composé, initialement nommé par erreur nicotinate arabinoside (Willeke et al., 1979a), a ensuite été corrigé par la même équipe (Upmeier et al., 1988). Le NaG est présent chez la pomme de terre, le théier, le cacaoyer, le tabac, la pervenche de Madagascar, le chrysanthème (*Chrysanthemum coronarium*) et *Arabidopsis thaliana* (Koster et al., 1989; Ikemeyer & Barz, 1989; Matsui et al., 2007; Yin et al., 2007; Katahira & Ashihara, 2009; Ashihara et al., 2012; Ashihara & Deng, 2012). Sa synthèse est réalisée par la nicotinate glucosyltransférase (EC 2.4.1.196) qui catalyse la conversion de l'UDP-glucose et de nicotinate en UDP et N- glucosylnicotinate. Dans des tubercules de pommes de terre, des expériences de marquage au ^3H -quinolinate ont montré que la synthèse de NaG par la voie de biosynthèse *de novo* du nicotinate passant par le NaR était largement majoritaire et que le NaG semble être un produit de stockage transitoire important chez la pomme de terre (Katahira & Ashihara, 2009).

Il a longtemps été pensé que le NaG et la trigonelline ne pouvaient pas s'accumuler conjointement chez les plantes (Willeke et al., 1979). Même si cette règle s'applique à de nombreuses plantes comme les Ptéridophytes, les Fabacées et les plantes de l'ordre des Malpighiales, d'autres plantes, bien que moins nombreuses, accumulent à la fois trigonelline et NaG, soit dans des proportions identiques comme les pommes de terre, les Cycas, soit en accumulant préférentiellement l'un des deux métabolites secondaires comme *Arabidopsis thaliana*, le tabac et le cacaoyer (Ashihara et al., 2012).

2- Les dérivés du nicotinamide

a- La ricinine

La ricinine, ou 4-Methoxy-1-méthyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile, est un alcaloïde dérivé du nicotinamide (**Figure 17** ; Johnson & Waller, 1974; Aniszewski, 2007). Cette molécule, qui est un poison, est présente principalement dans les téguments des graines de ricin (*Ricinus communis*) et représente 0,2% du poids frais des graines. Chez l'homme, la ricinine attaque le foie et les reins et peut causer un empoisonnement fatal.

b- Le N-méthylnicotinamide

Chez le ricin, on retrouve un autre alcaloïde à pyridine dérivé du nicotinamide, le N-méthylnicotinamide (**Figure 17**). Si la présence de ce composé est bien documentée chez d'autres organismes (Shibata & Murata, 1986), on ne le retrouve dans aucune autre espèce végétale étudiée dans la littérature (Matsui et al., 2007).

4- La régénération du NAD(P)H hydraté

De nombreux métabolites sont sujets à des altérations qui peuvent se produire spontanément ou sous l'action d'enzymes (Golubev, 1996; D'Ari & Casadesús, 1998; Tawfik, 2010), et les produits de ses réactions peuvent être toxiques sinon inutiles (Linster et al., 2013). C'est particulièrement le cas des coenzymes et cofacteurs qui sont intrinsèquement des composés chimiquement réactifs et qui nécessitent à priori des systèmes de réparation efficaces (Linster et al., 2013). Le cycle nicotinamide du NADH et du NADPH peut subir une hydratation spontanée ou enzymatique en position C-6 pour donner des hydrates de ces composés, appelés NADHX et NADPHX qui sont des épimères (c'est-à-dire ne différant entre eux que par la configuration d'un seul centre asymétrique) *R* pour Rectus et *S* pour Sinister (Rafter et al., 1954; Oppenheimer & Kaplan, 1974; Marbaix et al., 2011). L'hydratation spontanée du NAD(P)H est favorisée par une baisse du pH ou des températures élevées (Linster et al., 2013). L'hydratation d'origine enzymatique est produite par une réaction secondaire des glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases GAPDH,

enzyme glycolytique (EC 1.2.1.12). Les NADHX et NADPHX ne peuvent agir comme donneurs ou accepteurs d'électrons et inhibent alors les déshydrogénases, ce qui les rend toxiques (Yoshida & Dave, 1975). Les deux hydrates sont reconvertis en NADH ou NADPH par une déshydratase ATP-ou ADP-dépendantes spécifiques de la forme S appelée déshydratase de réparation des nucléotides à nicotinamide (EC 4.2.1.136, NNRD pour « nicotinamide nucleotide repair dehydratase » ; **Figure 18**). Les formes R sont interconverties en formes S par une épimérase de réparation des nucléotides à nicotinamide (EC 5.1.99.6, NNRE pour « nicotinamide nucleotide repair epimerase » ; **Figure 18**) (Acheson et al., 1988; Colinas et al., 2014; Niehaus et al., 2014). Ces activités enzymatiques se retrouvent dans tous les règnes vivants, sont portées par un même polypeptide chez les archées et la plupart des bactéries, alors qu'elles se retrouvent portées par deux polypeptides distincts chez les Eucaryotes. Chez les plantes, ces deux enzymes sont adressées aux trois compartiments cytosolique, mitochondrial et surtout plastidial (Colinas et al., 2014; Niehaus et al., 2014). De manière spontanée, le NAD(P)HX peut se cycliser et donner du NAD(P)HX cyclique qui ne peut pas être pris en charge par le système NAD(P)HX épimérase, NAD(P)HX déshydratase. Cette forme cyclisée serait moins toxique pour la cellule (Colinas et al., 2014; Niehaus et al., 2014).

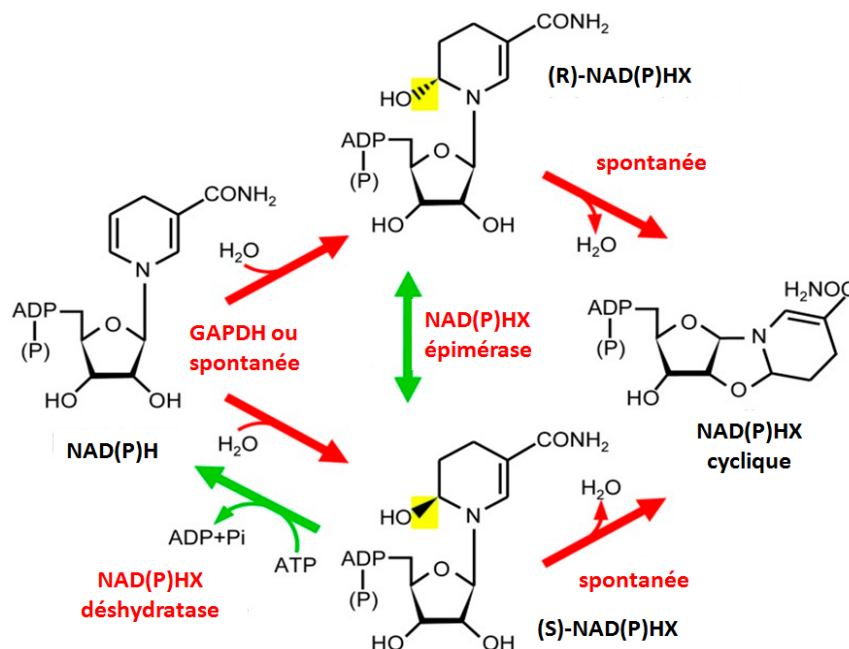


Figure 18. Réactions de dommages et réparations du NAD(P)H chez les plantes. GAPDH, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, NAD(P)HX, formes hydratées du NAD(P)H.

IV- La compartimentation et le transport subcellulaires du NAD chez les plantes

A- Distribution intracellulaire

La distribution des pools de NAD entre les compartiments subcellulaires est une question cruciale afin de comprendre plus finement les fonctions du NAD et la régulation de sa biosynthèse et de son renouvellement. En raison de leur importance dans le métabolisme cellulaire, la plupart des études mesurant les teneurs en nucléotides à pyridine se sont focalisées sur le NAD et le NADP. Il est généralement admis que ces nucléotides ont peu de chances de se déplacer entre les cellules, bien que leurs précurseurs puissent être transportés entre les tissus, de même que certains dérivés qui constituent des formes de stockage propres à certaines espèces végétales.

La plupart des mesures rapportées dans la littérature nécessite une extraction suivie de méthodes de mesures par couplage enzymatique qui permettent d'augmenter la sensibilité de détection des métabolites. Un défi majeur dans ces techniques est d'éviter les modifications de l'état des métabolites lors de la préparation de l'échantillon, problème qui devient particulièrement aigu lorsqu'un fractionnement des cellules est nécessaire avant dosage. Des artéfacts peuvent résulter d'échanges entre compartiments subcellulaires lors du fractionnement et de changements de l'état rédox des molécules puisque ces techniques perturbent l'intégrité et les fonctions cellulaires.

Des techniques comprenant des fractionnements non-aqueux ou une filtration rapide de protoplastes dans des tampons acides ou alcalins ont été utilisées pour contourner ces difficultés. Bien que relativement lente, la première technique permet d'éviter les fuites et fixe l'état métabolique, alors que la seconde méthode est plus rapide mais passe par une étape de préparation de protoplastes qui peuvent être facilement rompus par passage sur maille de nylon (Stitt et al., 1982; Gardeström, 1987; Heineke et al., 1991). Ces méthodes de fractionnement permettent de mesurer les niveaux des pools de NAD(P)H dans les fractions cytosoliques, mitochondriales et chloroplastiques rapportées en **Figure 19** (Heineke et al., 1991; Igamberdiev & Gardeström, 2003; Szal et al., 2008). Les teneurs en NAD et NADP dans ces

compartiments à la lumière varient dans une gamme de 0,1 mM à 2 mM, ce qui est dans la moyenne des concentrations intracellulaires mesurées chez les levures (Bogan & Brenner, 2008). C'est également ce qu'on retrouve chez des chloroplastes isolés (Takahama et al., 1981). Le pool de NADP(H) est le plus élevé dans le chloroplaste, certainement en lien avec les fonctions photosynthétiques du couple rédox dans ce compartiment subcellulaire. C'est dans la mitochondrie que l'on retrouve les pools teneurs en NAD(H) les plus importantes, mais si l'on regarde la contribution de chacun des compartiments en fonction du volume cellulaire occupé (sachant que le volume cytosolique est plus de 6 fois supérieur à celui mitochondrial dans les cellules du mésophylle) (Winter et al., 1994), le pool de NAD cytosolique contribuerait à la majeure partie du NAD cellulaire.

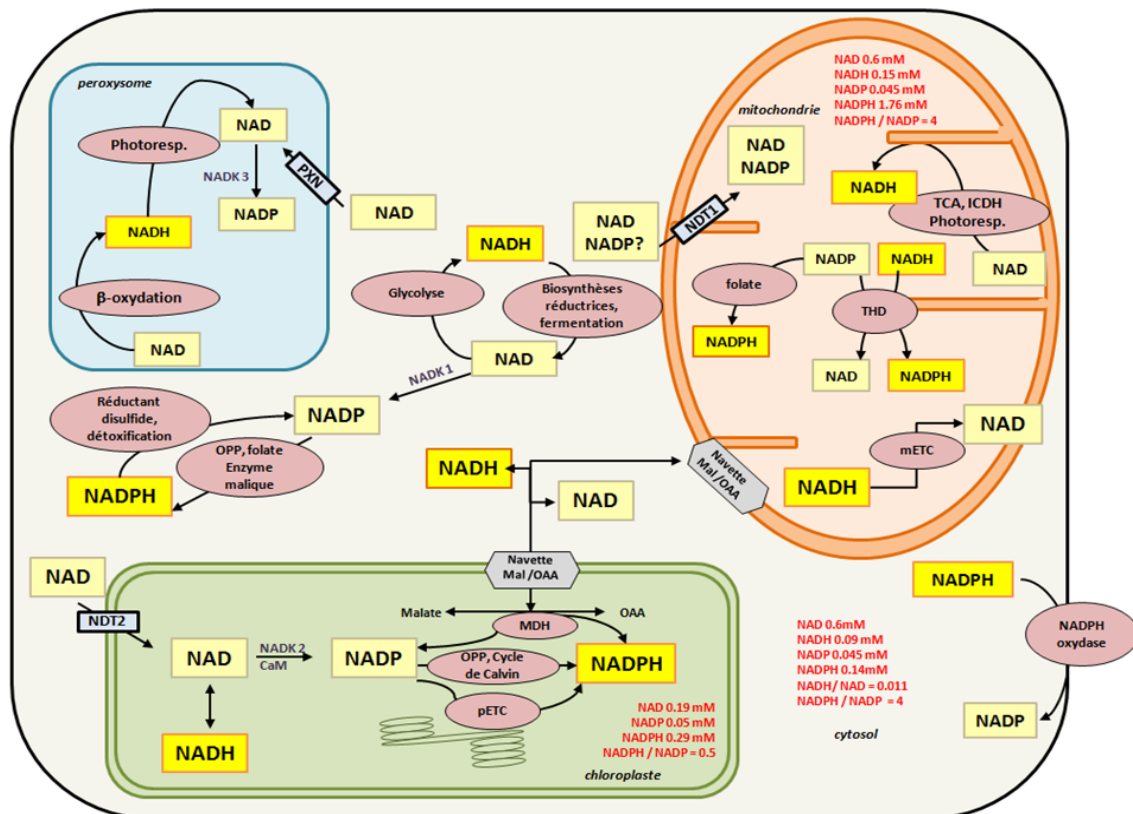


Figure 19. Concentration en nucléotides à pyridine dans les trois compartiments cytosol, chloroplaste et mitochondrie dans des cellules de plante à la lumière, et leurs processus de régénération. CaM, calmoduline ; ICDH, isocitrate déshydrogénase ; MDH, malate déshydrogénase ; mETC, chaîne de transfert d'électrons mitochondriale ; NADK, NAD kinase ; NDT, transporteur de nucléotides/nucléosides ; OAA, oxaloacétate ; OPP, cycle oxydatif des pentoses phosphates ; PXN, transporteur de nucléotides peroxysomal ; pETC, chaîne de transfert d'électrons chloroplastique ; Photoresp., photorespiration ; TCA, cycle des acides tricarboxyliques ; THD, transhydrogénase.

L'état rédox de ces pools varie considérablement suivant le compartiment considéré. Ainsi, à la lumière les pools de NAD et NADP sont jusqu'à 10 à 6 fois plus réduits respectivement dans la mitochondrie que dans le cytosol et les chloroplastes (**Figure 19**). Ainsi, dans les chloroplastes, le ratio NADPH/NADP⁺ est de 0,5 à la lumière alors qu'il est de 3 pour les mitochondries. Ce ratio diminue encore à l'obscurité en raison d'une forte diminution des teneurs en NADPH, alors qu'il reste stable dans les autres compartiments (Heineke et al., 1991; Igamberdiev & Gardeström, 2003; Szal et al., 2008). En effet, les teneurs en NADP⁺ et NADPH varient considérablement lors d'un passage de l'obscurité à la lumière, allant même jusqu'à s'égaliser transitoirement dans la demi-heure qui suit le passage à la lumière, et ses teneurs évoluent tout au long de la phase d'éclairement (Heber & Santarius, 1965).

Très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant (i) les teneurs en NAD, NADP dans les autres compartiments chez les plantes comme la vacuole, les peroxysomes et les noyaux ainsi que (ii) les teneurs en intermédiaires métaboliques (Guérard et al., 2011; Pétriacq et al., 2012). Des développements techniques sont en cours au laboratoire afin de mesurer les niveaux de NAD et NADP dans les noyaux afin de mieux cerner leur impact sur les mécanismes de contrôle épigénétique. De nouvelles techniques sont en cours de développement afin de quantifier *in situ* les teneurs en nucléotides à pyridine au sein des compartiments subcellulaires. On peut citer la technique de microscopie à photons multiples appliquée au NAD(P)H (Denk et al., 1990; König, 2000; Maulucci et al., 2014; Morris-Blanco et al., 2014), l'utilisation d'une sonde de poly-(ADP)-ribosylation couplée à une détection immuno-histochimique (Nikiforov et al., 2011) ou encore de détecteurs de fluorescence DUAL-PAM permettant de mesurer les pools de NADPH plastidiaux (Kauny & Sétif, 2014).

Les concentrations habituellement rapportées pour les nucléotides à pyridine ne distinguent pas les fractions libres de celles liées aux protéines, et il est possible que les teneurs en NAD disponibles soient limitantes pour le fonctionnement des enzymes. Chez les mammifères, il a été estimé que 50% du pool de NAD des

érythrocytes était libre (Canepa et al., 1991). Des travaux menés sur des fractions mitochondriales de plante ont permis de déterminer que, dans ce compartiment, de 30 à 50% du NAD⁺ était lié aux protéines alors que seul 1/4 du NADH était à l'état libre (Hagedorn et al., 2004). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études qui ont aussi montré que les teneurs en NADH libre étaient maintenues constantes quelle que soit la teneur de NADH lié aux protéines (Kasimova et al., 2006).

B- Le passage des équivalents rédox NAD(P)/H entre les différents compartiments

Les différents compartiments disposent de systèmes réversibles d'échange de NAD(H) et NADP(H) qui permettent d'ajuster leur état rédox, comme les navettes (oxaloacétate/malate couplée ou non au transport d'aspartate et de glutamate ; trioses phosphates ; navette glycérol-3-phosphate ; Douce & Neuburger, 1989; Heineke et al., 1991; Shen et al., 2006) ainsi que des boucles de régénération des cofacteurs à NAD(P) assurant un équilibre entre consommation et production de pouvoir réducteur NAD(P)-dépendante au sein de voies métaboliques retrouvées dans l'ensemble du règne vivant (Stein & Imai, 2012; Hummel & Gröger, 2014; Kato & Lin, 2014).

En effet, de nombreux systèmes d'échanges de métabolites sont capables de transférer des équivalents rédox au travers des membranes mitochondriales et chloroplastiques et d'ainsi lier les pools de NAD entre les différents compartiments subcellulaires (**Figure 20** ; Raghavendra & Padmasree, 2003; Scheibe et al., 2005; Foyer et al., 2009). Ces systèmes impliquent la navette triose phosphate/3-phosphoglycérate, la navette malate/oxaloacétate et la navette malate/aspartate (Day & Wiskich, 1981; Journet et al., 1981; Heineke et al., 1991). La navette glutamate/2-oxoglutarate, qui est essentielle à l'assimilation de l'azote et à la réassimilation de l'ammonium, est aussi potentiellement impliquée dans les échanges d'équivalents rédox (Woo et al., 1987). Il existe aussi des systèmes d'échanges permettant de lier les pools de NAD entre peroxyosome et compartiment cytosolique (Reumann et al., 1994).

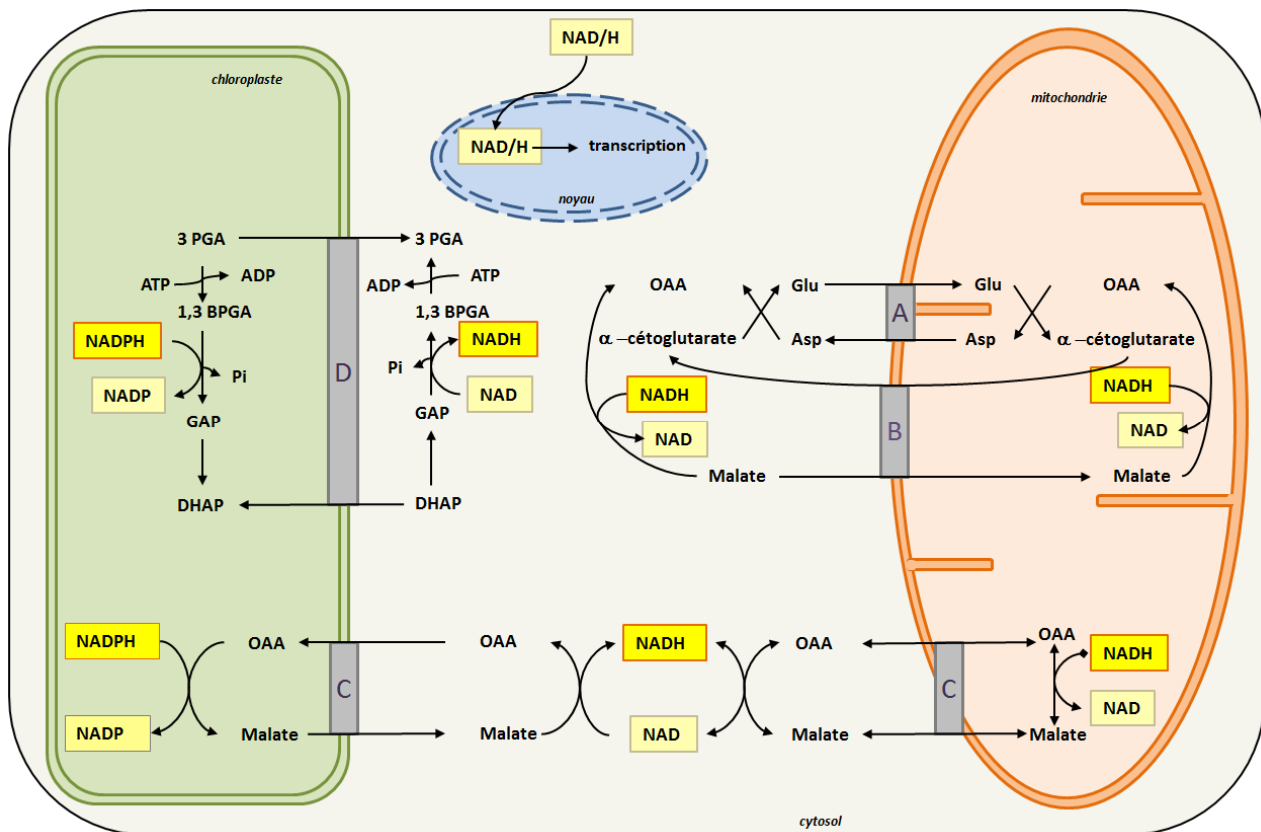


Figure 20. Navettes mitochondriales et chloroplastiques. A. Transporteur glutamate/aspartate. B. Transporteur α -cétoglutarate. C. Transporteur d'oxaloacétate. D, Transporteur de trioses phosphates. ADP, adénosine diphosphate ; Asp, Aspartate ; ATP, adénosine triphosphate ; 1,3BPGA, acide 1,3 bisphosphoglycérique ; DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; GAP, aldéhyde 3-phosphoglycérique ; Glu, Glutamate ; OAA, oxaloacétate ; 3PGA, acide 3-phosphoglycérique.

Chez les animaux, les levures et les plantes, une G3PDH localisée sur la membrane interne de la mitochondrie participe à l'oxydation d'équivalent rédox dans le cytosol (EC 1.2.1.12 ; Shen et al., 2003; Shen et al., 2006). Le site catalytique de la G3PDH membranaire est orienté vers le cytosol, ce qui lui permet d'oxyder le NADH cytosolique comme le font les NADH déshydrogénases mitochondriales (EC 1.6.5.3 ; Douce & Neuburger, 1989; Rasmusson et al., 2004; Shen et al., 2006). La G3PDH mitochondriale serait très importante pour l'oxydation du glycérol produit à partir des réserves lipidiques dans les graines en germination et les jeunes plantules (Shen et al., 2003).

C- Le transport intracellulaire des nucléotides à pyridine

Malgré l'existence de ces systèmes d'échanges rédox à fort débit, les données disponibles sur la biosynthèse du NAD au sein des cellules suggèrent un transport permettant l'entrée directe des nucléotides à pyridine dans les organites. En effet, déjà en 1983, une lente absorption de NAD^+ était observée par des mitochondries purifiées (Neuburger & Douce, 1983; Neuburger et al., 1985). Depuis lors, deux types de transporteurs permettant de faire passer des nucléotides à travers les membranes mitochondriales et plastidiales ont été identifiés. Deux transporteurs de NAD, NDT1 et NDT2, respectivement localisés dans le chloroplaste et la mitochondrie (**Figure 19**), ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* en se basant sur les séquences des transporteurs mitochondriaux de levure de la famille des MCF (pour « mitochondrial carrier family ») (Picault et al., 2004; Todisco et al., 2006; Palmieri et al., 2009). NDT1 et NDT2 peuvent échanger le NAD^+ contre le NaMN, le NMN ou le NaAD, de même que contre d'autres nucléotides comme l'ADP ou l'AMP, mais ni contre le nicotinamide ni contre le nicotinate (Palmieri et al., 2009). En effet, il a été montré que le NMN et dans une moindre mesure le NaMN pourrait être importés dans la mitochondrie et convertis en NAD chez le topinambour (*Helianthus tuberosus*; Di Martino & Pallotta, 2011). Chez l'Homme, le transporteur mitochondrial de nucléotides à pyridine transporte préférentiellement le NMN, lequel sert de substrat à la NMNAT afin de générer du NAD^+ dans le compartiment mitochondrial (Nikiforov et al., 2011).

Il a aussi été démontré que le NADP^+ , comme le NAD^+ , peut être importé dans des mitochondries isolées, ce qui suggère qu'il existe un transporteur de NADP^+ sur la membrane interne des mitochondries de plantes (Bykova & Møller, 2001).

Le NAD^+ et le NADH peuvent aussi être transportés au sein des peroxysomes par un transporteur appelé PXN (**Figure 19**). Ce transporteur de nucléotides NAD^+ , NADH, AMP et ADP peut aussi transporter le coenzyme A (CoA), le déphospho-CoA, l'acétyl-CoA et l'adénosine 3', 5'-phosphate (PAP) au sein de ce compartiment (Agrimi et al., 2012). PXN permet d'approvisionner le peroxysome en NAD^+ et acétylCoA nécessaires à la dégradation optimale des acides gras ainsi qu'à la remobilisation des réserves lipidiques, en particulier lors de la β -oxydation (Bernhardt et al., 2012).

Il est couramment admis que le NAD libre passe à travers les pores nucléaires pour être utilisé par les PARP et se lier à des protéines comme les histones désacétylases de type Sirtuines ainsi qu'à des facteurs de transcriptions régulés par les nucléotides à pyridine comme NPAS2 et CtBP (Zhang et al., 2002; Fjeld et al., 2003). L'état rédox cytosolique du couple NAD^+/NADH permettrait de relier le métabolisme cellulaire à la transcription des gènes (Fjeld et al., 2003).

D- Le transport extracellulaire des nucléotides à pyridine

Chez les plantes, Il est couramment admis que le NAD et le NADP œuvrent à l'intérieur des cellules pour réguler des processus de signalisation intracellulaire. Cependant, chez les animaux, le NAD(P) est aussi présent dans le compartiment extracellulaire où il peut (i) soit se lier aux récepteurs du plasmalemme pour y être métabolisé en cADPR et NaADP, (ii) être utilisé pour ADP-ribosyler des récepteurs de surface, déclenchant une cascade de signalisation cellulaire (Zhang & Mou, 2009). Il existe aussi un transport de nucléotides à pyridine du milieu extracellulaire vers l'intérieur des cellules. Le NAD^+ , qui est transporté dans le milieu extracellulaire, n'est pas directement transporté du milieu extracellulaire vers l'intérieur des cellules. Des NAD-glycohydrolases et nucléotide diphosphatases localisées sur la surface externe des cellules dégradent le NAD^+ en NMN, lequel est à son tour converti par une 5'-nucleotidase, également extracellulaire, en nicotinamide riboside. Le nicotinamide riboside extracellulaire produit entre alors dans la cellule *via* des transporteurs à nucléoside (SLC28 et SLC29 ; Zhang et al., 2013) et alimente la synthèse de NAD^+ intracellulaire (Aleo et al., 2001; Nikiforov et al., 2011). Le NAD(P) peut être aussi relargué dans l'espace extracellulaire en réponse à une stimulation où par une fuite de ces métabolites lors de processus inflammatoires (Contreras et al., 2003; Smyth et al., 2004; Bruzzone et al., 2006). Le NAD(P) relargué dans l'espace extracellulaire animal peut être métabolisé par CD38 (une des ADPR-cyclases animales) pour produire cADPR et NaADP impliqués dans la signalisation calcique (Billington et al., 2006; Bruzzone et al., 2006) ou par les enzymes qui permettant de faire rentrer le NAD dans les cellules (Aleo et al., 2001; Nikiforov et al., 2011).

Chez les plantes, il a été montré que la réaction d'hypersensibilité induite par des agents pathogènes entraîne une fuite des nucléotides à pyridine dans le milieu extracellulaire à des concentrations suffisantes pour induire l'expression de gènes PR (pour « pathogenesis-related ») et la résistance aux agents pathogènes. De plus, ces effets semblent dépendants de la signalisation calcique (Zhang & Mou, 2012 ; Fu & Dong, 2013). D'autres expériences ont montré qu'en infiltrant des protoplastes avec du NAD⁺ et NADP⁺, que les niveaux de nucléotides à pyridines intracellulaires ne varient pas, suggérant que ces molécules ne sont pas transportées vers l'intérieur des cellules chez les plantes (Zhang & Mou, 2009). En revanche, des cellules végétales mises en présence de quinolinate incorporent bien ce précurseur du NAD⁺ puisque les niveaux de NAD sont augmentés, en particulier lorsque les cellules expriment une QPT dans le compartiment cytosolique (Pétriacoq et al., 2012). Chez les levures, le quinolinate, mais aussi le nicotinate et le nicotinamide riboside peuvent être à la fois importés et excrétés dans le milieu extracellulaire, alors que le nicotinamide est uniquement importé.

Deux transporteurs de type perméase ont été identifiés, Nrt1 et Tna1, qui permettent l'incorporation du nicotinamide riboside et du quinolinate, respectivement chez les plantes (Belenky et al., 2011; Ohashi et al., 2013). Ces échanges de nucléotides à pyridine entre milieu et cellules permettraient de stocker ces métabolites dans le milieu et de les réutiliser à souhait afin de maintenir des concentrations intracellulaires appropriées en NAD (Ohashi et al., 2013). Chez les plantes, un autre précurseur du NAD, le NaMN, fourni à des plantules de pomme de terre, stimule leur croissance. D'autre part, des plantules colonisées par des Burkholderia, bactéries promotrices de la croissance des plantes, poussent mieux lorsque la synthèse de NaMN bactérienne n'est pas altérée. Ces observations suggèrent que le NaMN peut être incorporé par les plantes pour stimuler leur croissance (Wang et al., 2006).

1- Transport des formes de stockage et d'alcaloïdes et trigonelline

Bien qu'une défense efficace basée sur la production d'alcaloïdes nécessite des systèmes de transports variés, peu de transporteurs d'alcaloïdes ont jusqu'ici été

identifiés. Chez le tabac, la nicotine est transportée de l'appareil racinaire vers l'appareil aérien. La synthèse de nicotine dans les racines et son accumulation dans les feuilles est stimulée par des stress comme des blessures (Cane et al., 2005). Un transporteur d'alcaloïde spécifique de la nicotine, lequel semble impliqué dans le métabolisme et la localisation de la nicotine dans la plante, a récemment été identifié, mais celui-ci n'est sans doute pas le seul système permettant de transporter la nicotine des racines aux feuilles (Hildreth et al., 2011).

La trigonelline est une forme de stockage et de transport présente chez de nombreuses espèces végétales, en premier lieu les Fabacées, mais elle est aussi présente chez les Solanacées, les Astéracées, les Cucurbitacées, les Poacées comme le maïs (*Zea mays*) et l'orge (*Hordeum vulgare*) et les Brassicacées comme *Arabidopsis thaliana* (Willeke et al., 1979; Rhodes et al., 1989; Allen et al., 2010). Même si un transport de trigonelline a été mis en évidence chez les plantes entre les différents organes par des expériences de marquage (Heeger et al., 1976; Zheng et al., 2005), il restait à identifier des transporteurs de cet alcaloïde. Chez *Arabidopsis thaliana*, un transporteur de trigonelline a récemment été identifié (Jeanguenin et al., 2012). De manière intéressante, ce transporteur est une protéine de la classe des NiaP qui sont connus pour transporter le nicotinate et le nicotinamide chez les bactéries. En effet, le NiaP d'*Arabidopsis thaliana* transporte aussi le nicotinate. Le transporteur de trigonelline / nicotinate d'*Arabidopsis thaliana* transporte avec une forte affinité la trigonelline. Chez le maïs, trois transporteurs de nicotinate de type NiaP ont aussi été identifiés, lesquels ont une faible affinité pour le nicotinate et ne transportent pas la trigonelline. Ces transporteurs sont localisés sur le plasmalemme, participant au transport de ces alcaloïdes dans les cellules (Jeanguenin et al., 2012).

Très peu d'informations sont disponibles concernant le transport de la ricinine chez le ricin. Il semblerait cependant qu'elle soit détectée dans les sucs phloémiens (Holfelder et al., 1998).

2- Vers un rôle plus général de contrôle des systèmes de transport chez les plantes

Les recherches récentes menées chez les bactéries et les mammifères suggèrent qu'en plus de leurs rôles dans le métabolisme oxydatif et la signalisation cellulaire, les nucléotides à pyridine réguleraient les transports d'ions. En effet, il a été démontré que près d'une dizaine de systèmes de transports étaient régulés par les molécules de NAD(P)(H) et leurs produits NaADP^+ , ADPR et cADPR chez ces organismes. L'état rédox et les niveaux de nucléotides à pyridine participeraient au contrôle des échanges intra- et extra-cellulaires de potassium, de sodium et de calcium (Kilfoil et al., 2013).

V- Les fonctions du NAD

Le développement des plantes et leurs fonctions sont sous-tendues par des réactions rédox qui dépendent de co-facteurs comme le NAD. En effet, le NAD(P)(H) participe à de très nombreuses réactions d'oxydoréductions liées aux chaînes de transfert d'électrons ainsi qu'à un grand nombre de réactions enzymatiques indispensables au métabolisme et à la croissance des plantes. Par ses propriétés oxydo-réductrices, le NAD permet le transfert de pouvoir réducteur et la génération d'énergie au sein des cellules. Son état rédox et ses teneurs participent au maintien du potentiel rédox cellulaire et participe aux réactions de défenses faces aux attaques pathogènes. Outre ses implications dans les mécanismes rédox, le NAD est également impliqué dans de nombreuses réactions de signalisation (Hunt et al., 2004; Noctor et al., 2006). Ces fonctions qui reposent sur un clivage et donc une consommation nette de NAD, incluent la signalisation calcique, les mécanismes de réparation de l'ADN, la régulation de l'expression des gènes et probablement le contrôle d'étapes clef du métabolisme primaire (Hunt et al., 2007; Vanderauwera et al., 2007; Wang & Pichersky, 2007; Xing & Poirier, 2012) en réponse aux conditions de l'environnement (De Block & Van Lijsebettens, 2011; Pétriacq et al., 2012; Pétriacq et al., 2013). Par ses propriétés, le NAD contribue donc à la croissance et au développement harmonieux des plantes, mais aussi à leur acclimatation aux facteurs abiotiques et biotiques de l'environnement. Un aperçu de ces fonctions vous est présenté dans les pages qui suivent.

A- Les fonctions rédox du NAD et leurs implications

1- Les couples rédox $NAD(P)^+/NAD(P)H$

Le NAD(P) est un coenzyme transducteur de pouvoir réducteur, c'est à dire capable de transférer des électrons à une molécule d'état plus oxydée. Le NAD(P) existe ainsi sous forme réduite NAD(P)H ou oxydée $NAD(P)^+$. Un couple tel que le $NAD(P)^+/NAD(P)H$ est nommé couple rédox. La tendance des couples à accepter ou donner des électrons à un autre couple est appelée potentiel rédox. Ce potentiel rédox permet de traduire la faisabilité et la direction dans laquelle les électrons sont transférés entre composants d'un système biochimique. Tous les potentiels rédox sont définis en fonction de leurs capacités à recevoir ou donner des électrons à une électrode normale à hydrogène (solution 1 M de H^+ , pH 0 dans laquelle est immergée une électrode de platine), et sont exprimés en volts. En biologie, les potentiels rédox sont définis à pH 7 et à 25°C, ce qui pour le couple de référence $H_2/2H^+$ donne -420 mV puisque le potentiel rédox est dépendant du pH et diminue de 60 mV par unité de pH. Ces potentiels rédox sont définis pour des couples à l'équilibre formes réduites/oxydées et sont appelées potentiels de demi-réduction désignés par l'abréviation E_m pour « Equilibrium midpoint potential ». De ces valeurs de potentiels rédox il est possible de déterminer une différence de potentiel rédox entre deux couples rédox qui permet le transfert d'électrons ΔE_m (E_m accepteur- E_m donneur). Par exemple, dans la mitochondrie au cours du transfert d'électrons du donneur NADH à l'accepteur O_2 , le $\Delta E_m=0,82-(-0,32)$ V soit 1,14 volts et permet de déduire le changement d'énergie libre de la réaction, qui ici est exergonique. Au cours du transfert en sens inverse de l'eau au $NADP^+$ lors de la photosynthèse la valeur sera identique mais le signe sera inversé et la réaction sera endergonique et nécessitera de l'énergie apportée sous forme de lumière. Le NADP est le plus souvent utilisé comme agent de réduction dans les processus de biosynthèse (photosynthèse, assimilation de l'azote, biosynthèse des acides gras) alors que le NAD est impliqué dans les voies de catabolisme où il agit comme oxydant (la respiration principalement). Il existe au sein des cellules végétales plusieurs couples rédox majeurs qui, par leurs potentiels rédox et leurs concentrations respectives, régulent les transferts d'électrons au sein des cellules, en plus des flux membranaires chloroplastiques et mitochondriaux, et qui déterminent ainsi l'état rédox global des

cellules (**Tableau 1**). Ces composés ont des concentrations très variables selon l'état physiologique des cellules. En raison de leur potentiel rédox négatif, certains ont pour propriétés de réduire les contenus cellulaires comme les couples $\text{NAD(P)}^+/\text{NADPH}$, alors que d'autres comme les formes actives d'oxygène sont de puissants agents oxydants (Foyer & Noctor, 2005).

Tableau 1. Potentiels rédox approximatifs et concentrations intracellulaires des principaux couples rédox chez les plantes. ASC, ascorbate ; DHA, déhydroascorbate ; Fd, ferrédoxine ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; Ox, oxydé ; Red, réduit ; TRX, thiorédoxines (d'après Foyer & Noctor, 2005).

Couple Rédox	Potentiel Rédox (V)	Concentration (μM)
$\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}$	+0.82	200 – 300 (O_2)
$\text{O}_2 / \text{O}_2^{\cdot-}$	-0.3	<0.001 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)
$\text{O}_2^{\cdot-} / \text{H}_2\text{O}_2$	+0.94	1 – 100 (H_2O_2)
$\text{H}_2\text{O}_2 / \text{OH}^{\cdot}$	+0.54	Négligeable (OH^{\cdot})
$\text{OH}^{\cdot} / \text{H}_2\text{O}$	+2.2	-
DHA / ASC	-0.10	10 000 – 20 000
GSSG / GSH	-0.24	2 000 – 5 000
$\text{TRX}_{\text{ox}} / \text{TRX}_{\text{réd}}$	-0.33	10 – 100
$\text{NAD(P)}^+ / \text{NAD(P)H}$	-0.32	100 – 500
$\text{Fd}_{\text{ox}} / \text{Fd}_{\text{réd}}$	-0.42	10 – 100

2- Le rôle du NAD(P)H dans le maintien du potentiel rédox cellulaire

Si de faibles teneurs en oxygène ont accompagné les débuts de l'évolution des êtres vivants sur terre, pour lesquels la bioénergétique reposait essentiellement sur le fer et le soufre, l'apparition des cyanobactéries puis des plantes a conduit l'atmosphère à enrichir l'atmosphère en oxygène à des niveaux proches de ceux actuels depuis 550 millions d'années (Fournier, 2003). Les cellules aérobies font face à ces concentrations en oxygène en maintenant un environnement interne très réduit. Cela est rendu possible par les interactions existant entre les couples rédox non-protéiques et solubles que sont le NAD, le NADP, le glutathion (GSSG / GSH) et l'ascorbate (DHA / ASC). En particulier, les nucléotides à pyridine ($\text{NAD(P)}^+ /$

NAD(P)H) sont les principaux transmetteurs de transfert rédox des phases solubles des cellules. En effet, à l'opposé de composés antioxydants comme le glutathion et l'ascorbate qui réagissent spontanément avec l'oxygène, les nucléotides à pyridine réagissent lentement avec l'oxygène et leur oxydation est dépendante d'enzymes. Au sein des cellules, les pools de glutathion et d'ascorbate réagissent d'une part spontanément ou sous l'action d'enzymes comme les (per)oxydases avec l'oxygène, et sont d'autre part réduits par des réductases à haute capacité dont la catalyse dépend du pouvoir réducteur du NAD et du NADP (**Figure 21**). Le glutathion et l'ascorbate sont le rempart d'un système de tampon rédox de détoxification des formes actives d'oxygène dépendant du NAD(P). Une perturbation de ce système de maintien de l'état réduit des cellules génère une signalisation liée aux stress oxydoréductif que l'on rencontre dans nombre de processus de stress liés à des perturbations abiotiques, biotiques ou à des processus développementaux. Dans ces processus, le couple $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ joue un rôle particulièrement important car il est à la jonction des métabolismes produisant ou détoxifiant les ROS (**Figure 21**).

Dans les chloroplastes, la concentration en cofacteur oxydé NADP^+ disponible pour sa réduction par la ferrédoxine NADP^+ réductase détermine le flux d'électrons non linéaire vers d'autres accepteurs comme l'oxygène moléculaire (O_2). En cas de sur-réduction du pool de NADP en NADPH, en raison d'un stress environnemental qui occasionne soit un afflux d'électrons dans les cas de forte lumière, ou une non-utilisation du NADPH disponible pour les réactions métaboliques dans le cas de stress pathogènes, nutritionnels, froid ou sécheresse, les électrons sont déviés vers ces voies non linéaires et la formation de ROS est accélérée (Scheibe et al., 2005). Le NAD(P)H cytosolique est aussi un précurseur des ROS dans ce compartiment lorsqu'il est utilisé par les NAD(P)H oxydases (Foreman et al., 2003; Kwak et al., 2003). Le NAD(P)H serait aussi impliqué dans la génération de NO *via* la nitrate réductase (NR) et la nitrite réductase (Stöhr et al., 2001; Galeeva et al., 2012). La NR peut catalyser le transfert de pouvoir réducteur du NAD(P)H à l' O_2 et générer des ROS (Yamasaki & Sakihama, 2000). Quant à son rôle dans la production de ROS par la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale, les oxydases alternes pourraient être régulées par les changements de ratio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ sous l'effet de la lumière et du CO_2 (Igamberdiev & Gardeström, 2003). La gestion des ROS est

aussi très dépendante du NAD(P)H dans les cellules végétales. En effet, parmi les cinq grands systèmes de détoxification des ROS que sont (i) le cycle eau-eau (réaction de Mehler), (ii) les catalases (EC 1.11.1.6), (iii) le cycle des glutathion peroxydases (EC 1.11.1.9), (iv) le cycle ascorbate-glutathion et (v) la détoxification réductive des peroxydes, les trois derniers impliquent le glutathion et/ou l'ascorbate sous la dépendance du NAD(P)H (**Figure 21**) (Sunkar et al., 2003; Apel & Hirt, 2004; Mano et al., 2005; Noctor, 2006).

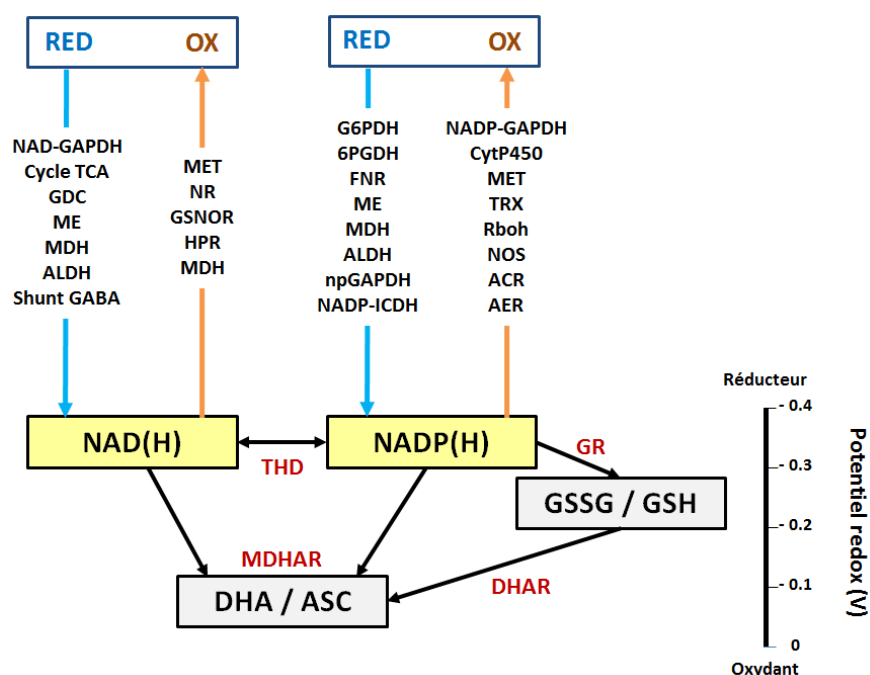


Figure 21. Schéma simplifié des principales réactions liant les couples rédox solubles NAD(P)⁺/H, ascorbate et glutathion. Importance est donnée aux principales réactions consommatrices/productrices de pouvoir réducteur fourni par les nucléotides à pyridine. AER, alcénal réductase; ACR, aldo-céto réductase; ALDH, aldéhyde déshydrogénase; ASC, ascorbate (réduit); Cyt, cytochrome; FNR, ferrédoxine-NADP réductase; GABA shunt, voie du γ -aminobutyrate; (np)GAPDH, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (non phosphorylante); GDC, glycine décarboxylase; G6PDH, glucose-6-phosphate déshydrogénase; GR, glutathion réductase; GSH, glutathion réduit; GSNOR, S-nitrosogluthatione réductase; GSSG, glutathion oxydé; HPR, hydroxypyruvate réductase; ICDH, isocitrate déhydrogénase; MDH, malate déshydrogénase; (M)DHA(R), (mono)déhydroascorbate (réductase); ME, enzyme malique; MET, mitochondrial électron transport; NOS, oxyde nitrique synthase; NR, nitrate réductase; OX, oxydation; 6PGDH, 6-phosphogluconate déshydrogénase; Rboh, NADPH oxydases (pour « Respiratory burst oxidase homologues »); RED, réduction; TCA, acide tricarboxylique; THD, transhydrogénase; TRX, thiorédoxine. D'après Noctor, 2006.

En raison de l'existence de potentiels rédox propres à chacun des couples rédox actifs au sein des compartiments subcellulaires, il est difficile de définir une valeur globale de l'état rédox cellulaire. Dans le cytosol et la mitochondrie, la NADP et le glutathion définissent un état rédox de l'ordre de -250 mV à -300 mV au sein de ces compartiments. L'état rédox du stroma chloroplastique à la lumière est un peu plus négatif, en raison des ferrédoxines qui conduisent les réactions de réduction, celle du NADP⁺ notamment (Asada, 1999; Setterdahl et al., 2003; Foyer & Noctor, 2005). Le NAD(P)⁺ est reconverti en NAD(P)H par des systèmes enzymatiques décrits en **figure 21**. Une description plus détaillée des réactions enzymatiques régénérant le NADPH a déjà été abordée dans le chapitre intitulé « NAD KINASES ». La transmission de pouvoir réducteur entre compartiments subcellulaires est assurée principalement par des systèmes de navettes décrit dans le chapitre « Le passage des équivalent rédox NAD(P)/H entre les différents compartiments » (**Figure 20**) ainsi que par le transport des nucléotides à pyridines par des transporteurs spécialisés (**Figure 19**) présentés dans le chapitre « Le transport intracellulaire des nucléotides à pyridine ». De même, pour répondre à un besoin en pouvoir réducteur, notamment à la lumière ainsi qu'en situation de stress, les cellules végétales ont la capacité de stimuler la production d'enzymes clef qui contrôlent la synthèse de NAD(P) comme l'AO, la QPT, la NaMNAT et les NAD kinases (voir chapitre « Les voies de synthèse du NAD chez les plantes »). Chez les plantes le passage à la lumière induit la production de NAD kinase (Tezuka & Yamamoto, 1975) qui permet la synthèse de NADPH dans le chloroplaste, laquelle est indispensable à la synthèse de chlorophylle et à la fixation du carbone (Chai et al., 2005).

B- Le rôle du NAD(P)/H dans les grandes voies métaboliques

La plupart de la matière organique terrestre est fabriquée par les plantes grâce à l'assimilation du carbone inorganique et de l'azote de l'environnement en molécules organiques. La matière organique est produite et régénérée par des processus moléculaires dépendants de l'énergie solaire que sont la photosynthèse, et l'assimilation de l'azote. Les cellules eucaryotes compartimentent ces processus biochimiques dans les différents organites en s'appuyant sur les cycles métaboliques pour transférer les équivalents réducteurs à travers les membranes intracellulaires.

Le NAD(P)H produit ou échangé entre les compartiments sert de porteur d'électrons permettant le maintien de l'homéostasie rédox et des biosynthèses réductrices. La description abordée dans ce chapitre ne se prétend pas exhaustive mais souligne plutôt les interactions qui existent entre les grandes voies du métabolisme primaire et les niveaux de nucléotides à pyridine ainsi que leur état rédox.

1- Le NAD(P)H dans le métabolisme carboné

Les composés carbonés jouent un rôle essentiel dans les processus métaboliques de tous les organismes vivants. Ils servent comme source d'énergie et comme éléments structuraux des cellules vivantes. Le carbone inorganique est assimilé par les plantes en utilisant le pouvoir réducteur du NADPH et l'énergie sous forme d'ATP produits lors de la photolyse de l'eau. La matière organique formée sert de matériel de construction aux glucides, lipides et composés protéiques et les processus respiratoires permettent de générer du NADH et de l'ATP et de recycler les composés carbonés et azotés.

a- Le NADPH et la fixation du carbone après réactions de photolyse

La voie anabolique par laquelle tous les organismes photosynthétiques incorporent le CO₂ est connue sous le nom de cycle de Calvin ou de réduction photosynthétique du carbone (PCR) (Calvin & Benson, 1949). Ce cycle se subdivise en trois parties, (i) une carboxylation qui fixe le CO₂ en présence d'un sucre accepteur qu'est le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) qui est alors converti en acides à trois carbones et qui est catalysée par la Rubisco, (ii) une réduction qui consomme le NADPH et l'ATP produits à la lumière par la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique et qui convertie les acides à trois carbones en trioses phosphates, (iii) et enfin une étape de régénération des trioses phosphates en RuBP qui consomme de l'ATP. L'excès de trioses phosphates ainsi formé sert de maillon de base à la biosynthèse de l'ensemble des molécules organiques de la plante et peut être exporté vers les autres compartiments subcellulaires. Au sein du chloroplaste, le NADPH est formé à la lumière par la chaîne de transferts d'électrons photosynthétique via la ferrédoxine NADP-réductase (Talts et al., 2007). Il peut être échangé avec le compartiment cytosolique par la valve malate (Scheibe & Jacquot,

1983) qui comprend un système de biosynthèse de malate par la MDH et un système de navette (**Figure 19**) et provenir à l'obscurité ou dans les tissus non chlorophylliens des voies des pentoses phosphates plastidiales et/ou cytosoliques (Spielbauer et al., 2013) . Au sein du chloroplaste, le NADPH ainsi produit régule une Thiorédoxine réductase de type C dépendante du NADPH (NTRC, EC 1.8.1.9) qui, en réduisant l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase, EC 2.7.7.27) permet d'activer la synthèse où la dégradation de l'amidon (Ekkehard & Stitt, 1989; Sparla et al., 2006; Michalska et al., 2009; Valerio et al., 2011; Bernal-Bayard et al., 2012). Outre son rôle dans la régénération du pool d'antioxydants plastidiaux (König et al., 2002; Pérez-Ruiz et al., 2006), le système NADPH-NTRC jouerait un rôle important dans la régulation de la synthèse des chlorophylles (Richter et al., 2013). Ces régulations métaboliques de la fixation du carbone, dépendant du système NADPH-NTRC, s'exercent de concert avec l'action des thiorédoxines dans le compartiment plastidial (Geigenberger & Fernie, 2014).

b- La production de NADP

Outre la synthèse et/ou la dégradation de l'amidon et de la chlorophylle qui sont régulées par le NADPH, la biosynthèse des lipides et plus particulièrement celle des acides gras, est une forte consommatrice de NADPH, d'ATP et de squelettes carbonés produits par la photosynthèse. En effet c'est exclusivement dans le plaste que se produit la synthèse dite *de novo* des acides gras (Ohlrogge & Browse, 1995). L'acide gras synthase (ou FAS pour « fatty acid synthase » ou « fatty-acyl-CoA synthase, EC 2.3.1.86) qui intervient dans la biosynthèse *de novo* des acides gras, est un complexe multienzymatique qui consomme du NADPH pour réaliser des condensations successives d'unités malonyl-CoA sur de l'acétyl-CoA jusqu'à obtention de l'acide palmitique. Ainsi la synthèse d'une molécule d'acide palmitique se fait à partir de 8 molécules d'acétyl-CoA et consomme à elle seule 14 molécules de NADPH et sept d'ATP. C'est ce qui explique pourquoi la synthèse des acides gras est étroitement coordonnée avec les réactions claires de la photosynthèse (Geigenberger & Fernie, 2014). A l'inverse, le catabolisme des lipides qui conduit à la formation de saccharose pendant la germination des graines à réserves lipidiques produit du NADH dans les glyoxysomes par β -oxydation des acyl-CoA sous l'action de la MDH du cycle du glyoxylate, alors qu'une isoforme cytosolique de la MDH

produit aussi du NADH. Par ce processus, les graines oléagineuses en germination convertissent très efficacement les lipides en sucres tout en fournissant du pouvoir réducteur en abondance sous forme de NADH (Graham, 2008).

c- Impact de l'importance du NADP(H) dans le métabolisme primaire de la plante

Dans la respiration réalisée par les plantes, les composés carbonés sont décomposés pour assurer la synthèse d'ATP qui fournit l'énergie requise aux processus cellulaires. D'une manière globale, on peut dire que les glucides et les lipides sont transformés en acides organiques que la mitochondrie utilise pour réduire le NAD^+ en NADH. Le NADH est alors oxydé et les électrons sont transférés à l'oxygène moléculaire par la chaîne de transfert d'électrons de la membrane interne mitochondriale. Dans ce processus, des complexes enzymatiques pompent les protons à travers la membrane, créant un gradient de potentiel utilisé pour la synthèse d'ATP. Cette voie catabolique se déroule en trois principales étapes que sont la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques (TCA ou cycle de Krebs) et le transfert membranaire des électrons. Dans la première étape appelée glycolyse, les hexoses-phosphates sont convertis en trioses-phosphates puis en acides organiques, en pyruvate notamment, produisant du pouvoir réducteur sous forme de NADH sous l'action de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase phosphorylante (G3PDH, EC 1.2.1.9). Il existe aussi une isoforme non phosphorylante décrite précédemment (voir section intitulée les NAD kinase) qui permet de générer du NADPH. Chez les plantes, les enzymes intervenant dans la glycolyse sont fonctionnellement et physiquement étroitement associées à la mitochondrie (Giegé et al., 2003; Graham et al., 2007) et chez la pomme de terre du degré d'association des enzymes glycolytiques dépendrait l'intensité respiratoire (Graham et al., 2007). Le pyruvate ainsi formé par la glycolyse passerait directement dans la matrice mitochondriale (Lunn, 2007) où il serait alors converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase encore appelée pyruvate décarboxylase (EC 1.2.4.1). Notons que des enzymes glycolytiques comme la G3PDH (GAPDH) peuvent se retrouver dans le noyau et y générer du NADH en conditions de stress (Vescovi et al., 2013). Il n'est pas exclu non plus que l'hexokinase puisse s'y trouver, à l'instar de ce qui est observé chez d'autres organismes (Kim & Dang, 2005). La seconde étape, appelée cycle des acides tricarboxyliques (Krebs, 1937), consiste en

l'incorporation de l'acétyl-CoA dans un cycle d'acides organiques transformés par des réactions enzymatiques qui permettent de générer du pouvoir réducteur sous forme de NADH et de FADH₂ (Rasmusson & Møller, 1990). Si le cycle des acides tricarboxyliques permet d'oxyder complètement le pyruvate en CO₂, chez les plantes le cycle ne fonctionne généralement pas de façon cyclique, probablement parce que le cycle TCA fonctionne en accord avec des besoins métaboliques propres à chacun des organes en fonction des conditions environnementales (Hanning & Heldt, 1993; Sriram et al., 2004; Alonso et al., 2007; Allen et al., 2009; Tcherkez et al., 2009; Gauthier et al., 2010). Aussi, chacune des étapes qui permettent la production de NADH serait inhibée par un ratio NADH/NAD⁺ élevé, ce qui permettrait d'équilibrer l'oxydation du pyruvate avec la phosphorylation oxydative qui se produit sur la membrane interne des mitochondries (Geigenberger & Fernie, 2014). Dans une troisième étape, le pouvoir réducteur, formé par le cycle TCA et la glycolyse, transfère ses électrons à l'oxygène moléculaire via la chaîne de transfert d'électrons de la membrane interne mitochondriale, et un gradient de protons générateur d'ATP est créé. Les plantes disposent sur cette chaîne de transfert d'électrons d'enzymes uniques au règne végétal appelées NAD(P)H déshydrogénases alternes, situées aux faces internes et externes de la membrane mitochondriale, qui leur permettent de réguler les niveaux de NAD(P)H cellulaires et optimiser leur croissance (Rasmusson et al., 2004; Rasmusson & Wallström, 2010; Wallström et al., 2014).

L'un des problèmes métaboliques majeur auxquels la plante doit faire face à la lumière est la gestion du manque d'accepteur d'électrons NADP⁺ qui peut être à l'origine d'une production massive de ROS. En effet, généralement la chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques produit plus d'équivalents réducteurs que requis dans le chloroplaste pour la synthèse des sucres (Stitt, 1986). La limitation en CO₂ disponible pour le cycle de Calvin et le manque de NADP⁺ ou d'autres accepteurs du photosystème I conduit à la formation de ROS qui doivent être détoxifiés par divers systèmes dont celui NAD(P)H-glutathion-ascorbate décrit précédemment (chapitre intitulé « Le rôle du NAD(P)H dans le maintien du potentiel rédox cellulaire »). Il existe cependant certains mécanismes qui évitent de manquer d'accepteurs d'électrons dans le chloroplaste. (i) Le premier d'entre-eux s'appelle la valve malate (Scheibe, 1984). Il consiste en la synthèse de malate à partir de la

malate déshydrogénase plastidiale NADPH-dépendante (MDH-NADP), et le malate ainsi formé est exporté vers le cytosol via une navette (navette C, **Figure 20**) (Taniguchi et al., 2002). La valve malate rééquilibre le ration NADPH/ATP, évite les déséquilibres qui limitent le flux d'électrons photosynthétique, et redirige l'excès de pouvoir réducteur vers d'autres compartiments où il sera utilisé (Backhausen et al., 1998; Scheibe, 2004). De plus, la MDH-NADP est activée par la lumière et au contraire inhibée par les ratios élevés $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, ce qui en fait un système efficace de contrôle de l'homéostasie rédox du NADP(H) au sein du compartiment plastidial, adapté aux variations d'intensité lumineuse (Scheibe & Jacquot, 1983; Scheibe et al., 2005). L'importance de cette enzyme est démontrée par le caractère létal de mutants ADN-T homozygotes chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Selinski et al., 2014). (ii) Un second mécanisme est utilisé par les plantes lorsque la limitation d'accepteurs d'électrons devient importante ainsi qu'en conditions de forte lumière où de sécheresse : il s'agit du transfert cyclique des électrons (CET pour « cyclic electron transfer ») (Munekage et al., 2004). Ce système permet de diminuer la production de NADPH, de recycler les électrons non utilisés pour sa synthèse en l'absence d'accepteur en quantité suffisante, tout en augmentant la production d'ATP, et permet de rééquilibre le ratio ATP/NADPH (Miyake, 2010). Dans des conditions de CO_2 limitant où de manque continu d'accepteur NADP^+ , ce système évite ainsi une production massive de ROS au sein des chloroplastes (Foyer et al., 2012). (iii) Le troisième mécanisme mis en jeu dans les cellules chlorophylliennes à la lumière est la photorespiration. Ce mécanisme constitue un puits majeur pour les équivalents réducteurs, particulièrement lorsque la demande en NADPH et ATP pose problème, par exemple à fort intensité lumineuse, forte température et lorsque les stomates, fermés, provoquent une limitation importante en CO_2 pour la photosynthèse (Foyer et al., 2009; Voss et al., 2013). En réassimilant l'ammonium produit par la décarboxylation de la glycine (principalement par la glutamine synthétase GS, EC 6.3.1.2, et la glutamate synthase dépendante de la ferrédoxine Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1, ou celle dépendante du NADH, la NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14), la photorespiration consomme des équivalents réducteurs de la ferrédoxine, du NADH et de l'ATP et régénère les équivalents oxydés à nouveau disponibles pour la fixation d'électrons de la chaîne de transfert photosynthétique. Il semble aussi que la photorespiration stimule l'activité de l'AOX en raison de la décarboxylation de la glycine, accélérant l'oxydation du NADH en NAD^+ et le flux

d'électrons de la chaîne de transfert mitochondriale vers l'oxygène (Igamberdiev et al., 1997; Vishwakarma et al., 2014). La photorespiration libère aussi du CO₂ dans la mitochondrie, ce qui permet de consommer le NADPH en excès et régénérer du NADP⁺ au niveau du cycle de Calvin (Riazunnisa et al., 2006; Busch et al., 2013). On estime qu'en conditions atmosphériques normales, pour quatre tours de cycle de Calvin, un tour de cycle forme du 2-phosphoglycolate (2-PGA), produit de l'activité oxygénase de la Rubisco (Zhu et al., 2008). Si l'impact d'un inhibiteur de la photorespiration sur la photooxydation est connue depuis longtemps (Wu et al., 1991; Kozaki & Takeba, 1996; Osmond & Grace, 1996), ce n'est que plus récemment que l'impact d'une photorespiration défectueuse sur l'inhibition du photosystème II a été décrite (Takahashi et al., 2007). En raison de leur gaine périvasculaire qui permet de concentrer le CO₂, les plantes en C₄ ont une activité photorespiratoire plus faible, mais non nulle, en raison des fuites au niveau des gaines, lesquelles sont plus importantes chez les dicotylédones que chez les monocotylédones et sont dépendantes de l'âge des plantes (Dai et al., 1995; Maroco et al., 1997). Chez *Amaranthus edulis*, la photorespiration compte pour 6% de la photosynthèse nette et des mutants photorespiratoires sont incapables de pousser en l'absence de fort CO₂ (Dever et al., 1996; Lacuesta et al., 1997). La mise en évidence de l'existence d'une activité photorespiratoire chez le maïs est plus ancienne encore (Chollet, 1976), et des mutants à faible activité glycolate oxydase sont incapables de pousser dans l'air (Zelitch et al., 2009), démontrant l'importance des mécanismes photorespiratoires chez toutes les espèces végétales (Wingler et al., 2000).

2- Le NAD(P)/H et le métabolisme azoté

En plus de la lumière, de l'eau et du CO₂, les éléments minéraux sont requis pour la croissance et le développement des plantes. Parmi les éléments minéraux, l'azote est sans doute le plus essentiel puisqu'il est utilisé pour la synthèse des acides aminés qui sont les briques de construction des protéines, des nucléotides, de la chlorophylle et de nombreux autres métabolites et composants cellulaires (Taiz & Zeiger, 2008). L'azote est donc requis en grandes quantités afin de permettre aux plantes d'enrichir la synthèse de squelettes carbonés en molécules plus complexes

indispensables à la production de biomasse. Comme nous le verrons ci-dessous, les nucléotides à pyridine jouent ici encore un rôle déterminant dans l'assimilation de l'azote par les plantes et participent à la coordination étroite des métabolismes carboné et azoté nécessaire à une croissance harmonieuse des plantes.

Dans la section précédente, nous avons vu que la photorespiration implique un recyclage du carbone assez complexe et nécessite aussi le recyclage de l'ammonium provenant de la décarboxylation de la glycine. Cette dernière réaction est catalysée par la glycine décarboxylase ou GDC (EC 1.4.4.2 ; Keys et al., 1978). L'ammonium produit par la GDC est assimilé au niveau du cycle GS/GOGAT dans le chloroplaste sous forme de glutamate par l'utilisation de deux enzymes localisées à la fois dans le chloroplaste et dans la mitochondrie : la GS (GS2), et la GOGAT, majoritairement la Fd-GOGAT (GLU1) et de façon minoritaire la NADH-GOGAT (Hayakawa et al., 1994; Taira et al., 2004; Jamai et al., 2009) (**Figure 22**). Le flux métabolique de la photorespiration est très important et la conversion mitochondriale de la glycine vers la sérine produit beaucoup d'ammonium, jusqu'à 10 fois plus que n'en produit l'assimilation primaire de l'azote (Keys et al., 1978; Rachmilevitch et al., 2004). Ce processus qui est encore appelé cycle de l'azote photorespiratoire (Keys et al., 1978) (**Figure 22**) utilise les mêmes isoformes de GS et GOGAT que celles impliquées dans l'assimilation primaire de l'ammonium (Hirel & Lea, 2002). En générant du NADH dans les mitochondries, ce processus peut contribuer à l'augmentation du pool de NADH dans le cytosol à la lumière.

Toutes les plantes ont la capacité de réaliser l'assimilation primaire des nitrates. Cette assimilation débute par la réduction des nitrates en nitrites catalysée par la nitrate réductase (NR, EC 1.7.1.1), réduction qui nécessite du NADH (Mifflin, 1970; Vincentz & Caboche, 1991) et pour certaines isoformes du NADPH (NR-NADPH, EC 1.7.1.3 ; Savidov et al., 1998). La NR est régulée d'une manière très complexe, permettant d'engager de manière contrôlée, en réponse à des signaux de l'environnement, la réduction des nitrates en étroite coordination avec l'assimilation du carbone. En général, elle est coordonnée avec la photosynthèse et est régulée par différents facteurs comme la teneur en nitrates, la lumière, la disponibilité en O₂ et en CO₂ (Campbell et al., 1988; Faure et al., 1991; Vincentz & Caboche, 1991). La

capacité des chloroplastes et des mitochondries à délivrer des équivalents réducteurs au cytosol peut influencer le taux d'assimilation des nitrates (Krömer & Heldt, 1991; Hanning & Heldt, 1993). A l'inverse, une faible photosynthèse peut limiter l'activité NR par une baisse de la disponibilité en réducteurs (NADH) et par une inactivation post-traductionnelle de l'enzyme (Kaiser et al., 2000; Kaiser et al., 2002). La présence d'une nucléotide pyrophosphatase (EC 3.6.1.9) physiquement associée à la NR chez *Brassica oleracea* suggère un contrôle étroit des teneurs en NADH au voisinage même de l'enzyme afin de moduler son activité (Moorhead et al., 2003).

Comme décrit précédemment dans ce chapitre, les teneurs et l'état rédox des nucléotides à pyridine contrôlent étroitement les activités des grandes voies des métabolismes carboné et azoté. Réciproquement, l'activité métabolique module les teneurs en NAD(P)/H et répond aux conditions de l'environnement. L'un des concepts principaux de l'intégration des métabolismes azoté et carboné chez les plantes repose sur leur utilisation des équivalents réducteurs et d'ATP. En effet, il est admis que l'assimilation de nitrate est forte consommatrice de pouvoir réducteur, alors que la fixation du CO₂ nécessite plus d'ATP que de pouvoir réducteur. Dans ce cas, l'ATP est aussi fourni par les autres compartiments subcellulaires, notamment la respiration mitochondriale, alors que le pouvoir réducteur consommé dans le cytosol par la nitrate réductase est en partie fourni par une sortie d'équivalents réducteurs des plastes et de la mitochondrie. Pour résumer, on peut dire que la fixation du carbone consomme trois fois plus d'ATP que l'assimilation des nitrates et que l'assimilation des nitrates consomme trois fois plus de pouvoir réducteur que la fixation du CO₂ en trioses phosphates (Woo et al., 1985; Noctor & Foyer, 1998).

Plusieurs études indiquent que les niveaux de NAD(H) jouent un rôle dans l'intégration des métabolismes carboné et azoté, notamment celles abordant l'étude des mutants du complexe I mitochondrial comme le mutant CMS II de tabac (Dutilleul et al., 2005; Hager et al., 2010; Podgórska et al., 2014). L'arrêt de l'oxydation du NADH par le complexe I entraîne une activation des NAD(P)H déshydrogénases et conduit à un phénotype de plantes riches en azote. Celles-ci présentent une augmentation générale des teneurs en acides organiques et acides aminés, en particulier des amines (Dutilleul et al., 2005; Hager et al., 2010). En effet, une plus forte assimilation des nitrates est observée chez CMSII (Dutilleul et al., 2005; Pellny

et al., 2009). On retrouve chez les mutants du complexe I d'autres caractéristiques typiques du statut riche en N : répression de la croissance des racines latérales, répartition altérée de la biomasse entre les racines et les parties aériennes en réponse à la disponibilité en azote (Pellny et al., 2008). D'autres exemples montrent que la nutrition azotée, qui constitue un puits de pouvoir réducteur majeur dans les plantes, influe fortement sur le métabolisme carboné. Ainsi lorsque l'alimentation azotée repose sur l'ammonium, la teneur en NADH, qui n'est plus utilisé pour l'assimilation des nitrates, augmente. Les plantes augmentent alors l'activité de leurs voies respiratoires alternes (NAD(P)H déshydrogénases, AOX et les protéines de découplage) (Escobar et al., 2006), non génératrices d'ATP, ce qui aboutit à une moindre croissance des plantes.

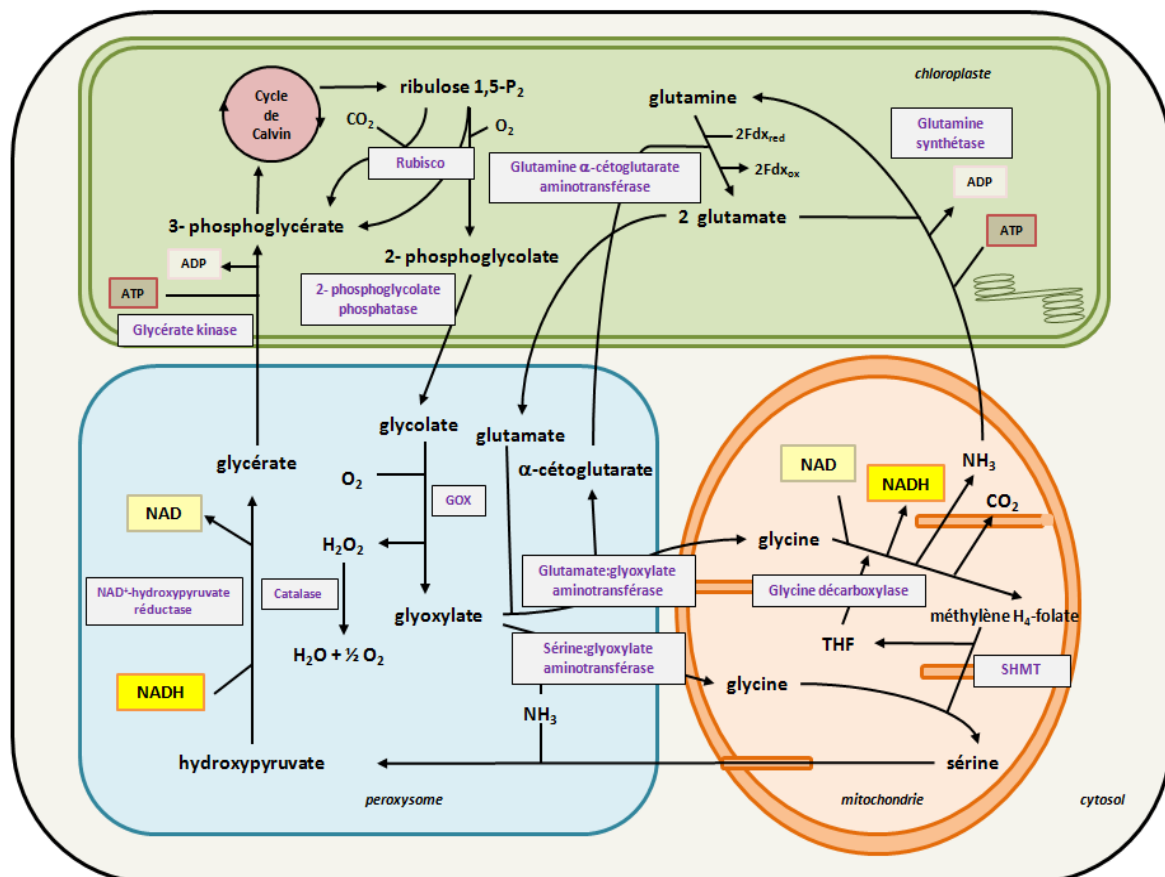


Figure 22. Schéma simplifié des voies du métabolisme carboné en C₂. ADP, adénosine diphosphate ; ATP, adénosine tri-phosphate ; GOX, glycolate oxydase ; NAD est indiqué pour NAD⁺ ; SHMT, sérine hydroxy-méthyltransférase ; THF, tétrahydrofolate (D'après Buchanan et al., 2000).

L'un des mécanismes permettant de rééquilibrer les ratios ATP/NAD(P)H entre compartiments repose sur le fonctionnement de transporteurs d'acides organiques comme la valve malate. Lorsque celle-ci est supprimée, cela est létal (Selinski et al., 2014). Par contre lorsque la capacité de la valve malate est simplement limitée, cela induit une augmentation de l'assimilation de l'azote et de la glycolyse au sein du compartiment plastidial, en accroissant les activités Fd-GOGAT, NADH-GOGAT et NAD-GAPDH plastidiale, ce qui potentiellement rééquilibre les ratios ATP/NAD(P)H à l'intérieur du chloroplaste (Selinski et al., 2014). Donc la valve malate défectueuse est compensée par une augmentation de la glycolyse plastidiale pour couvrir la demande plastidiale d'ATP. Autrement, il y aurait trop de NADPH dans le plaste qui bloquerait la chaîne de transfert d'électrons et donc la génération d'ATP nécessaire à la fixation du carbone (Selinski et al., 2014; Selinski & Scheibe, 2014).

C- Le rôle du NAD(P)/H dans les processus développementaux

Le développement des plantes est caractérisé par l'apparition de nouveaux organes et détermine des événements qualitatifs, repérables dans le temps et soutenus par des processus métaboliques. Qui dit processus métaboliques dit implication de cofacteurs essentiels comme le NAD(P)/H qui leur est indispensable. C'est ainsi qu'on va retrouver des teneurs en nucléotides à pyridines très variables selon les organes sur une même plante, et que ces teneurs évoluent en fonction de l'âge des organes étudiés. Les teneurs variables en différents types de nucléotides à pyridine permettraient d'associer les nécessités physiologiques d'un programme développemental avec les activités métaboliques qui les sous-tendent. Les teneurs en ces cofacteurs et leur état rédox varient non seulement selon les organes, mais aussi selon leur âge, suggérant une étroite implication des niveaux de nucléotides à pyridine avec les processus d'organogénèse et de vieillissement des organes (Yamamoto, 1963). C'est ainsi que l'on mesure dans les organes de stockage comme les cotylédons ou l'albumen des niveaux de NAD^+ très élevés, alors que les niveaux de NADP(H) et le ratio NADP/NAD sont faibles. A l'inverse, dans les tissus en croissance active, le ratio NADP / NAD est élevé. Dans les organes floraux d'*Arabidopsis thaliana* on observe aussi une très forte accumulation de NAD(P)(H) dans le pollen alors que de très faibles teneurs sont mesurées dans les pétales et le

pistil (Hashida et al., 2013a). Avec l'âge de la plante on observe plutôt une modification de l'état rédox du NADP (Wang & Pichersky, 2007). Par exemple les ratios NADPH/NADP⁺ diminuent avec l'âge tant dans les cotylédons, les hypocotyles, les racines, les feuilles et les fleurs (Yamamoto, 1963; Queval & Noctor, 2007; Wang & Pichersky, 2007).

1- Le rôle du NAD dans la germination des graines

La germination est la naissance d'une plantule à partir d'une graine, qui se caractérise par le passage de la vie latente de la graine à une vie active, sous l'effet de facteurs favorables. C'est un processus physiologique qui commence par le début de l'hydratation de la semence et qui finit par la croissance de la radicule (Evenari et al., 1966). Ainsi, une semence a germé lorsque la radicule a percé le tégument de la graine (Come, 1970). Des événements métaboliques majeurs ont lieu durant la germination, impliquant les pools de nucléotides libres.

En effet, la percée radriculaire, qui est précédée d'une forte consommation d'ATP, se caractérise par une forte augmentation des teneurs en NADP(H) et une consommation des pools de NAD(H) (Brown, 1965). Puisque le ratio NADP(H)/NAD(H) diverge fortement entre graines non-dormantes et dormantes (Gallais et al., 1998), et alors que les teneurs en NADP sont difficiles à mesurer pour des graines dormantes, les mesures en NAD sont parfois utilisées comme indicateur de la profondeur de dormance des graines (Hunt & Gray, 2009). Chez les gaines non-dormantes d'*Arabidopsis thaliana*, l'augmentation du ratio NADP(H)/NAD(H) s'accompagne d'une forte élévation des activités NAD kinases, alors que chez les graines dormantes les NADP phosphatases sont très actives (Hunt & Gray, 2009). Dans les graines dormantes d'avoine (*Avena sativa*), on retrouve également une forte activité NADP phosphatase (Gallais et al., 2000).

La baisse des teneurs en NAD observée à la germination peut être aussi due aux activités nicotinamidases. Il est en effet observé chez des mutants d'insertion ADN-T d'*Arabidopsis thaliana*, que la mutation du gène *nic2* inhibe la germination. Cette inhibition pourrait être due à l'accumulation de nicotinamide inhibant les PARP,

ainsi qu'à l'accumulation de NAD^+ dans les graines (Hunt et al., 2007). En effet, en traitant des semences avec les différents nucléotides à pyridine, il a été démontré que les formes oxydées NAD^+ et aussi NADP^+ inhibaient la germination de semences d'*Arabidopsis thaliana* (Hunt et al., 2007).

D'autre part, chez des graines en germination, il peut être observé une remobilisation des réserves en nucléotides à pyridine comme c'est le cas pour la trigonelline. En effet l'activité trigonelline déméthylase est induite pendant la germination de graines de café et de haricot mungo, cela s'accompagnant d'une baisse de l'activité trigonelline synthase et concomitamment des stocks de trigonelline dans les graines (Shimizu & Mazzafera, 2000; Zheng et al., 2005). Il semble donc que, pendant la germination, le NAD soit remobilisé, probablement pour permettre un redémarrage du métabolisme et répondre à des besoins comme la production de ROS qui intervient dans les processus de signalisation requis à l'émergence radriculaire, comme la signalisation ABA, la signalisation calcique et la signalisation rédox (Oracz et al., 2009; El-Maarouf-Bouteau et al., 2014). La production de ROS dépendante du NADPH semble en effet indispensable au déclenchement de la germination puisque l'absence de la NADPH oxydase de type B et de la production de ROS qui lui est associée empêche chez *Arabidopsis thaliana* les graines de germer (Müller et al., 2009).

2- Le rôle du NAD(P)(H) dans la reproduction sexuée

Au cours de la transition florale, le méristème apical passe d'un stade végétatif à un stade d'inflorescence. Cet événement est indispensable à la formation des appareils reproducteurs et nécessite l'intervention d'un panel de gènes et de réactions impliquant de nouvelles biosynthèses et le métabolisme rédox.

En effet, chez l'épinard (*Spinacia oleracea*) cultivé en jours longs, la transition florale s'accompagne d'une déplétion du pool de nucléotides à pyridine (Bonzon et al., 1983). De même chez *Arabidopsis thaliana*, les pools de NAD foliaires augmentent fortement lors de la transition florale et ce jusqu'au déclenchement de la floraison. Le NADP suit le même profil que celui du NAD, mais avec des teneurs plus

faibles par rapport au NAD (**Figure 23**) (Queval & Noctor, 2007). Une fois la floraison initiée, les teneurs en NAD s'effondrent dans les feuilles de rosette (Queval & Noctor, 2007b). Dans les plantes en fleurs, les teneurs en NAD⁺ des fleurs sont trois fois plus élevées que dans les feuilles de rosette (Wang & Pichersky, 2007). L'ensemble de ces données suggère une remobilisation des pools de NAD⁺ foliaires vers les organes reproducteurs.

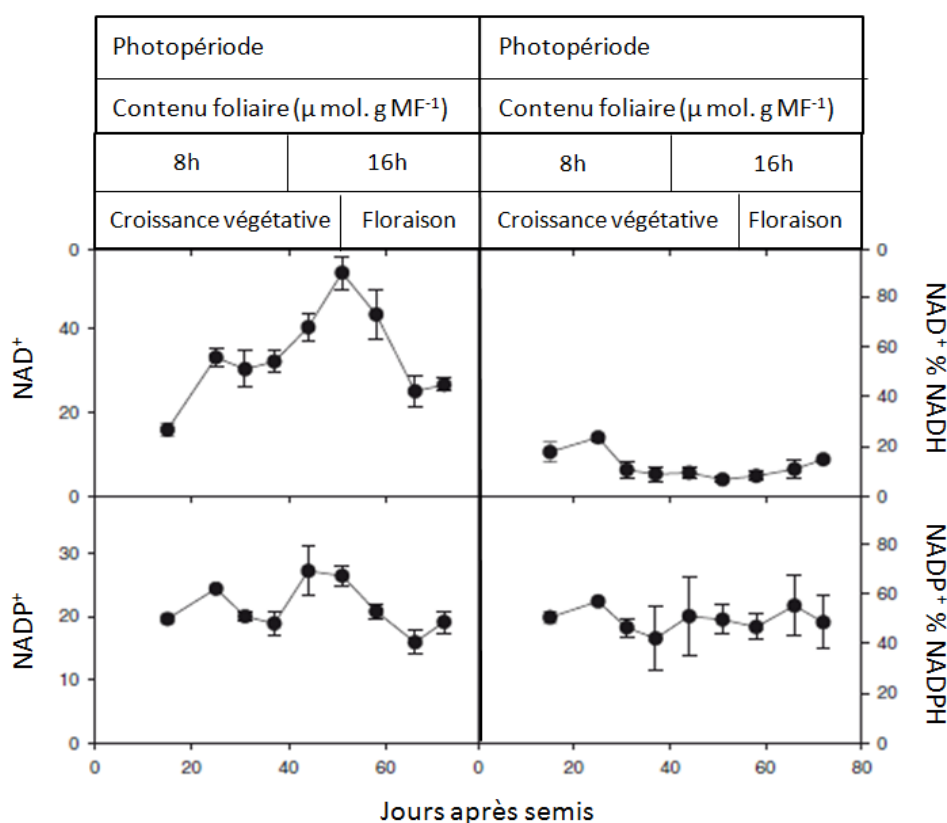


Figure 23: Evolution des niveaux de NAD et NADP dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* au cours du développement (d'après Queval & Noctor, 2007).

L'état rédox des nucléotides à pyridine semble également jouer un rôle dans la transition florale. Ainsi, chez *Nicotiana sylvestris*, l'augmentation du ratio NADPH/NADP⁺ provoqué par une diminution de l'activité d'une NADPH déshydrogénase 1 mitochondriale (NDB1), entraîne une induction florale associée à l'expression de gènes présents dans les méristèmes floraux (Liu et al., 2009b), probablement en lien avec un métabolisme rédox altéré (Kocsy et al., 2013). Chez

Arabidopsis thaliana, il est également observé une augmentation d'un facteur trois du ratio NAD^+/NADH par rapport à celui des feuilles de rosette, et d'un facteur deux pour le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Wang & Pichersky, 2007). Si la signification physiologique de cette observation n'est pas clairement établie, il est possible que l'état rédox du pool de NAD et du NADP joue un rôle dans la physiologie des organes reproducteurs.

Effectivement, les niveaux de NAD^+ participeraient au destin du grain de pollen en régulant négativement la germination puisque des pollens de plante ayant 25% de NAD en moins germent prématurément (Hashida et al., 2013a ; Hashida et al., 2013b). Par ailleurs, on constate une très forte augmentation des teneurs en NAD(P)H lors de la germination du grain de pollen et la progression du tube pollinique (Cárdenas et al., 2006). Le NAD qui est accumulé dans le grain de pollen diminue lors de la germination (Hashida et al., 2013a) et il est alors observé une production de NAD(P)H dans la région subapicale du tube pollinique en croissance (Cárdenas et al., 2006). Cette production de NAD(P)H est associée à une forte production de ROS en présence d'une forte densité de mitochondries (Cárdenas et al., 2006). Les fortes teneurs en NAD dans les tubes polliniques en croissance résultent probablement d'une biosynthèse accélérée, puisqu'une forte activité NMNAT a été détectée dans les microspores au stade post-méiotique en développement chez *Arabidopsis thaliana* (**Figure 24**; Hashida et al., 2007). Aussi, chez des mutants hétérozygotes *nmnat*, aux niveaux de NAD diminués de 25%, la croissance du tube pollinique est altérée, montrant l'importance de la biosynthèse du NAD pour la croissance du tube pollinique (Hashida et al., 2007).

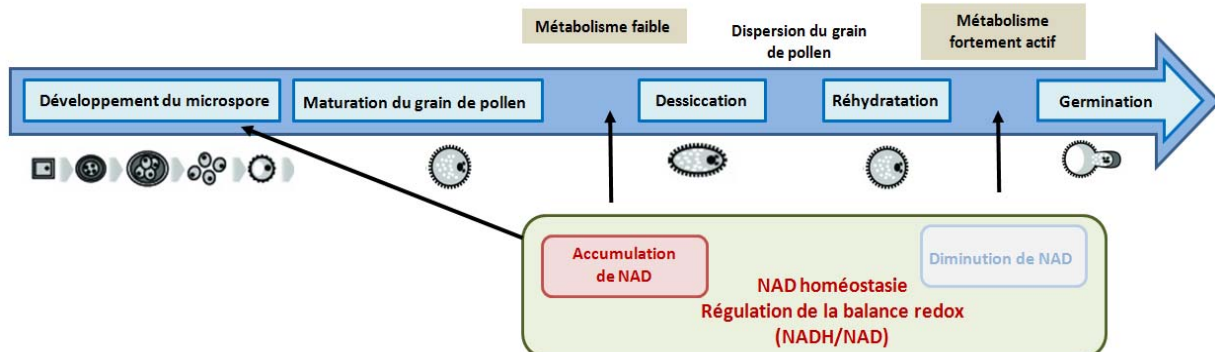


Figure 24: Représentation du rôle de l'homéostasie du NAD lors de la germination du pollen orthodoxe (d'après Hashida et al., 2013c).

Comme vu précédemment, la production abondante de NAD(P)H dans les régions subapicales des tubes polliniques en croissance co-localise avec une intense production de ROS. Des données transcriptomiques indiquent clairement la présence de NADPH oxydases (RbohH et RbohJ) dans le gamétophyte mâle (Sagi & Fluhr, 2006). Chez *Nicotiana tabacum*, il a été montré que l'activité NAD(P)H oxydase jouerait un rôle important dans la croissance des tubes polliniques (Potocký et al., 2007; Marino et al., 2012). Les ROS produites massivement à l'apex des tubes polliniques par les NAD(P)H oxydases RbohH et RbohJ, activées de façon synergique par le calcium et par phosphorylation, coordonneraient l'expansion cellulaire au degré d'exocytoses nécessaires à la synthèse des parois, en limitant les poussées de croissance liées à la signalisation calcique (Lassig et al., 2014; Kaya et al., 2014).

3- Le rôle du NAD dans le développement racinaire

L'élongation des racines et des poils absorbants, qui est essentielle à l'absorption de l'eau et des éléments minéraux du sol, est conditionnée par une production de ROS dépendante des NADPH oxydases (Foreman et al., 2003; Torres & Dangl, 2005; Cárdenas, 2009; Centeno et al., 2011; Müller et al., 2012; Nestler et al., 2014). Comme pour les tubes polliniques en croissance, la production de ROS dans les poils absorbants est située à l'apex et induit l'activation de canaux calciques (Foreman et al., 2003; Cárdenas, 2009). Comme pour le pollen, les oscillations de taux de croissance sont synchronisées avec des oscillations calciques, de pH et de ROS (Monshausen et al., 2007; Monshausen et al., 2009). Les NADPH oxydases génèrent des ROS qui permettent un remodelage de la paroi cellulaire dans les cellules en croissance (Monshausen et al., 2007). Les NADPH oxydases initient la production de ROS apoplastique, laquelle est amplifiée chez *Zea mays* par des peroxydases qui utilisent du NADH et du peroxyde d'hydrogène comme substrat (Liszky et al., 2004). Chez *Phaseolus vulgaris*, l'activité des NADPH oxydases est nécessaire à la production de ROS répondant aux facteurs Nod ce qui induit une courbure spécifique du poil absorbant suivi d'un arrêt de la croissance momentanée ou local (Cárdenas et al., 2008). Enfin, le développement de racines latérales semblerait impliquer les NADPH oxydases en réponse à une signalisation dépendante de l'auxine (Gibson et al., 2012; Müller et al., 2012).

D- Le NAD dans les réponses aux contraintes de l'environnement

En plus de leurs rôles développementaux, les événements consommant du NAD sont connus pour jouer un rôle dans les réponses aux stress environnementaux. On distingue traditionnellement deux types de stress qui vont influencer négativement la croissance de la plante : (i) les stress biotiques, qui résultent de l'action d'organismes vivants et qui portent préjudice à la plante, tels que les attaques de bactéries et de champignons pathogènes, l'action des ravageurs ou de l'homme, et (ii) les stress abiotiques, qui peuvent être d'origine physique (températures extrêmes, manque d'eau, manque d'oxygène, excès ou insuffisance de lumière), ou d'origine chimique (carence ou excès en éléments minéraux, pH du sol, ozone, substances chimiques toxiques).

1- Le rôle du NAD dans les réactions de défense face aux pathogènes

Les agressions provoquées par les agents pathogènes, bactéries, champignons, ravageurs ou virus, peuvent entraîner des pertes considérables en rendement. Parmi les stratégies mises en place par les plantes pour se défendre, le métabolisme du NAD y joue un rôle central par le contrôle qu'il exerce sur le statut oxydoréductif des cellules et ses fonctions de signalisation cellulaire. Des modulations des niveaux de NAD ont été observés dans les plantes soumises aux attaques d'agents pathogènes (Pétriacq et al., 2012; Pétriacq et al., 2013). Par exemple chez l'orge, l'infection par *Blumeria graminis* (ex *Erysiphae graminis*) var *hordei*, agent pathogène responsable de l'oïdium chez les céréales, s'accompagne d'une augmentation des niveaux de NAD⁺ et d'une redistribution du NADP⁺ des plastides vers le cytosol (Ryrie & Scott, 1968).

Les ROS produits par les NADPH oxydases participent à la réponse immunitaire des plantes. De très nombreuses études ont mis en évidence une participation active des NADPH oxydases, principalement de type D et F, en association avec des niveaux élevés en NAD, dans la réponse des plantes aux attaques pathogènes (Torres et al., 2002; Yoshie et al., 2002; Yoshioka et al., 2003; Torres et al., 2005; Fagard et al., 2007; Zhang et al., 2007; Asai et al., 2008; Galletti

et al., 2008; Alkan et al., 2009; Belhaj et al., 2009; Lherminier et al., 2009; Pogány et al., 2009; Asai et al., 2010; Mersmann et al., 2010; Perchepped et al., 2010; Proels et al., 2010; Chaouch et al., 2012). Dans la plupart des situations, une diminution de l'expression des NADP oxydases entraîne une baisse de la production de ROS, ce qui altère la mise en place de la mort cellulaire mise en place pour bloquer la prolifération de l'agent pathogène (Marino et al., 2012). Alors que certains pathogènes, les nécrotrophes, bénéficient d'une production de ROS dépendante des NADPH oxydases pour se développer (*Botrytis cinerea* et *Alternaria brassiciola*; Pogány et al., 2009; Asai et al., 2010), dans la majorité des cas la production de ROS se fait au détriment du pathogène car elle l'empêche de progresser (Marino et al., 2012). De l'ensemble de ces études, deux rôles se distinguent pour la production de ROS dépendantes des NADPH oxydases, (i) un rôle dans les défenses basales (ou principalement PTI pour « *PAMP-triggered immunity* ») qui limitent l'étendue de la maladie (Zhang et al., 2007; Galletti et al., 2008), et (ii) un rôle dans la reconnaissance spécifique d'effecteurs pathogènes qui provoque une réaction d'hypersensibilité entraînant la mort cellulaire, dans le but de bloquer la progression de l'agent pathogène et le détruire (Torres et al., 2002; Yoshie et al., 2002).

L'implication des ROS est généralement associée à des niveaux de NAD plus élevés suggérant une participation des voies de biosynthèse dans la réponse aux agents pathogènes (Ryrie & Scott, 1968; Dutilleul et al., 2003b). C'est ainsi que la surexpression d'une réductase NADPH-dépendante (NADPH-dépendante HC-toxine réductase), impliquée dans la neutralisation d'une toxine pathogène chez le riz, entraîne une forte élévation des teneurs en nucléotides à pyridine qui résulte de l'augmentation des activités NAD synthétase et NAD kinase, rendant la plante moins sensible à l'attaque de la bactérie pathogène produisant la toxine (Hayashi et al., 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, en conditions d'interactions compatibles ou incompatibles avec *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, l'expression du gène *NAD kinase 1* est fortement induite, probablement pour permettre une synthèse de NADPH dans le compartiment cytosolique (Berrin et al., 2005). Chez le tabac, les blessures provoquées par des ravageurs induisent la synthèse de nicotine, dérivé du NAD, laquelle est induite par une surproduction de QPT (Baldwin & Ohnmeiss, 1993; Sinclair et al., 2000). Un système inductible d'enrichissement en NAD en surproduisant la QPT d'*Escherichia coli*, *nadC*, chez *Arabidopsis thaliana*, a permis

de mettre en évidence l'implication d'une augmentation de la biosynthèse du NAD dans la résistance des plantes à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato-AvrRpm1* (*Pst-AvrRpm1*). Cette résistance dépendante du NAD est associée à l'induction de gènes marqueurs de la voie SA comme *PR1* et *ICS1* et une accumulation d'acide salicylique libre (Pétriacq et al., 2012; Pétriacq et al., 2013). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Zhang et Mou qui ont montré qu'une application de NAD extracellulaire induit une meilleure résistance des plantes à *Pseudomonas* via une voie dépendante de l'acide salicylique (Zhang & Mou, 2009; Zhang & Mou, 2012). Dans l'étude menée sur les plantes surexprimant *nadC*, il a également été montré une forte induction des transcrits aspartate oxydase (AO) en réponse à l'infection par *Pst* (Pétriacq et al., 2012). Ces observations sont corroborées par les données fournies par Genevestigator qui montrent une régulation transcriptionnelle de l'enzyme en réponse à diverses infections bactériennes (Zimmermann et al., 2004). L'AO a sans doute une importance particulière dans la production de NAD en réponse aux stress biotiques puisqu'on retrouve cette enzyme au sein d'un cluster de gènes de résistance chez *Phaseolus vulgaris* (David et al., 2009). Récemment, le laboratoire de Cyril Zipfel a confirmé l'implication de l'AO dans la réponse des plantes à la bactérie phytopathogène *Pst*. Un mutant ADN-T de l'AO, appelé *fin4* (pour « *flagellin-insensitive 4* »), est sévèrement affecté dans l'accumulation de ROS en réponse à l'éliciteur flg22 chez *Arabidopsis thaliana* (Macho et al., 2012). L'AO est nécessaire à l'accumulation de ROS dépendante de la NADPH oxydase D requise pour la fermeture des stomates en réponse aux PAMP (Macho et al., 2012).

Le clivage du NAD participe aussi aux interactions plantes-agents pathogènes. C'est ainsi que chez un mutant d'insertion ADN-T *Sirt2* d'une Sirtuine d'*Arabidopsis thaliana*, on observe l'induction de l'expression du gènes *PR1* et des gènes de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique (SA) comme *PAD4*, *EDS5* ou *SID2*, ce qui les rend plus résistantes à l'infection par *Pst* (Buck et al., 2004; Wang et al., 2010). A l'opposé, des plantes surproduisant *Sirt2* montrent une plus grande sensibilité à *Pst* corrélée à une diminution des niveaux de SA. SIRT2, en consommant le NAD régulerait négativement les réponses basales des plantes en réponse à la bactérie phytopathogène *Pst*. D'autres résultats suggèrent un rôle de la polyADP-ribosylation (PAR) dans l'immunité des plantes. Par exemple, le traitement de plantules d'*Arabidopsis thaliana* par le 3-AB (3-aminobenzamide), un inhibiteur

des PARP, déclencherait l'induction des voies métaboliques secondaires liées aux réactions de défense ainsi que la production de ROS et un dépôt de callose en réponse à des effecteurs comme flg2 et efu18 (Adams-Phillips et al., 2010). Des mutants PARG d'*Arabidopsis thaliana* sont en outre plus sensibles à l'infection par *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise, en raison probablement de leur limitation à recycler des polymères d'ADP-ribose en NAD (Adams-Phillips et al., 2010). Plusieurs études montrent une implication de la protéine AtNUDT7 codant une NUDIX hydrolase dans la résistance aux stress biotiques (Bartsch et al., 2006; Ge et al., 2007; Adams-Phillips et al., 2008). AtNUDT7 est une glycohydrolase disposant d'une activité ADP-ribose pyrophosphatase. Le mutant *Atnudt7* est plus résistant à l'infection par *Pst* (Jambunathan et al., 2010) ainsi qu'à l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Bartsch et al., 2006). Cette résistance s'expliquerait par le fait que le mutant *nudt7* a des niveaux de NAD(P)H élevés et accumule des ROS, ce qui le rendrait davantage résistant aux agents pathogènes (Jambunathan et al., 2010). Une fois encore, ces résultats mettent en évidence l'impact négatif qu'exercent les enzymes de clivage du NAD sur la résistance des plantes aux stress biotiques.

2- Le rôle du NAD(P)H dans la réponse aux stress abiotiques

Plusieurs publications pointent un rôle de la concentration en NAD et des métabolites qui lui sont associés dans la résistance des plantes aux stress comme l'analyse de plantes de tabac déficientes en complexe I mitochondrial. Ces plantes qui respirent via des déshydrogénases alternes ont leur croissance réduite par leur respiration, mais leur résistance aux stress abiotiques est augmenté (Dutilleul et al., 2003b). Cette plus forte résistance s'accompagne d'une augmentation des teneurs en NAD⁺ et NADH sans modification appréciable des teneurs en NADP⁺, NADPH, H₂O₂, ascorbate ou glutathion (Dutilleul et al., 2003a; Dutilleul et al., 2003b; Dutilleul et al., 2005). Le maintien d'un niveau élevé d'antioxydants semble aussi un facteur prévenant l'apparition des lésions liées au froid chez le pois ou des plantes de blé soumis à la sécheresse (Kuraishi et al., 1968; Maciejewska & Kacperska, 1987; Zagdanska, 1990; Zagdanska & Kozdoj, 1994).

Les enzymes PARP qui sont induites par les stress sont des consommateurs majeurs de NAD puisque ces enzymes transfèrent des unités d'ADP-ribose aux protéines, libérant du nicotinamide et formant de longues chaînes d'ADP-ribose toxiques et induisant la mort cellulaire (Andrabi et al., 2006) avec une déplétion simultanée de l'ATP (Amor et al., 1998). Des lignées RNAi avec des niveaux d'activité PARP diminués ont une meilleure efficacité d'utilisation énergétique (EUE pour « Energy Use Efficiency ») en réduisant leur respiration mitochondriale et leur niveau de ROS, ce qui en fin de compte augmente leur tolérance aux stress abiotiques (De Block et al., 2005). Les transcrits *PARP1* et *PARP2* s'accumulent en réponse à des stress génotoxiques comme les rayons gamma et les ROS (Amor et al., 1998; Babiychuk et al., 2001; Doucet-Chabeaud et al., 2001). Il semble que selon la gravité des dommages causés par le stress, les PARP peuvent protéger ou aggraver les dommages à l'ADN (Briggs & Bent, 2011). Une faible activation des PARP conduirait à une protection alors qu'une forte activation conduirait à la mort cellulaire (Amor et al., 1998; Ogawa et al., 2009). Bien que les mécanismes restent incertains, le niveau de polyADP-ribose, synthétisé à partir du NAD est proportionnel à la sévérité du stress (Leist et al., 1997; Ha & Snyder, 1999). Il est intéressant de noter qu'une diminution des PARP augmente la tolérance au stress, possiblement en raison d'une diminution de la consommation de NAD (De Block et al., 2005). La diminution de la consommation de NAD pourrait influencer le métabolisme et la transduction de signaux comme ceux liées à l'ABA (Vanderauwera et al., 2007). En effet, la synthèse d'ABA consomme du NADP(H) (Barrero et al., 2005; Gonzalez-Guzman et al., 2012). Les autres enzymes consommant le NAD sont aussi impliquées dans la réponse aux stress abiotiques. Ainsi, des plantes de riz qui surexpriment une Sirtuine SRT2 de riz, *OsSRT1*, sont rendues plus résistantes au stress oxydant alors qu'une sous-expression du même gène induit la mort cellulaire, probablement en lien avec une activation des éléments transposables (Huang et al., 2007). Chez *Arabidopsis thaliana*, GFG1 (pour « growth factor gene 1 ») est une Nudix hydrolase porteuse de l'activité ADP-ribose pyrophosphatase. Elle est essentielle à la réponse aux stress abiotiques, probablement parce qu'elle dégrade les polymères d'ADP-ribose formés pendant les stress (Jambunathan & Mahalingam, 2006).

Le NADPH est un important porteur de pouvoir réducteur en particulier pour les systèmes de défense antioxydants. Chez le riz, les différentes NAD kinases sont induites de façon variable par de multiples stress abiotiques et les promoteurs des gènes NAD kinase comportent des domaines répondant à la chaleur, la sécheresse (Li et al., 2014). Chez *Arabidopsis thaliana*, le NADPH cytosolique est produit par la NAD kinase 3 (Chai et al., 2006), et un mutant pour cette NADK3 rend les plantes plus sensibles au stress oxydant. Les NAD kinase cytosoliques 1 et 3 sont induites par l'exposition aux stress abiotiques comme les stress induits par le méthyléviologène, une forte salinité ou un choc osmotique (Berrin et al., 2005; Chai et al., 2006). Chez le pois, l'activité NAD kinase calmoduline (CaM)-dépendante est connue pour être induite par un stress froid (Ruiz et al., 2002). Une plus forte sensibilité aux stress oxydants a été observée dans des plants déficients en NAD kinases (Berrin et al., 2005; Chai et al., 2005; Chai et al., 2006) en réponse à la salinité et la sécheresse (Zagdanska, 1990).

Parce que le générateur majeur de ROS chez les plantes est l'activité NADPH oxydase, les niveaux de NADPH peuvent être limitants pour la génération de ROS dans certains cas (Torres et al., 2002; Kawai & Murata, 2008). Une étude a montré que chez des plantes de tomates les NADPH oxydases sont impliquées dans la réponse aux blessures (Sagi & Fluhr, 2006). Une autre étude a montré que les NADPH oxydases sont nécessaires à la génération rapide et systémique de ROS induite par des blessures et que les ROS s'accumulent dans l'apoplaste des cellules à distance du site de blessure, suggérant que les NADPH oxydases sont impliquées dans la propagation des ROS (Miller et al., 2009). Les NADPH oxydases sont aussi impliquées dans la cascade de signalisation induite par la stimulation mécanique des poils absorbants (Monshausen et al., 2009). Il a été montré que l'ABA induisait l'expression des NADPH oxydases D et F pendant un stress osmotique dans les cellules de garde et que ces NADPH oxydases étaient indispensables à la fermeture des stomates ABA-dépendante et aussi influencée par les brassinostéroïdes (Kwak et al., 2003; Xia et al., 2009). La NaMNAT est aussi fortement exprimée dans les cellules de garde des stomates afin de fournir le NAD(P)/H en quantité suffisante pour produire des ROS via les NADPH oxydases. La sous-expression de la NaMNAT entraîne des niveaux de NAD et de ROS insuffisants pour assurer la fermeture des stomates (Hashida et al., 2010). En outre, la quantité de NAD produite sous l'action

de la NaMNAT permet de protéger les cellules du stress oxydant généré par la signalisation dépendante de l'ABA dans les stomates (Hashida et al., 2010). Le NAD régénéré par la NaMNAT participe à la production de ROS qui stimulent la production d'ABA (Kwak et al., 2003) laquelle active le clivage du NAD en cADPR. Ce dernier déclenche une signalisation calcique indispensable à la fermeture des stomates (Leckie et al., 1998; Allen et al., 2001).

E- Le rôle central de l'homéostasie du NAD dans la croissance, le développement et la production de biomasse des plantes.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, le métabolisme du NAD revêt une grande importance pour le métabolisme primaire des plantes et leur réponse aux contraintes de l'environnement. L'impact du métabolisme rédox et énergétique sur la productivité et la résistance des plantes aux stress est d'ailleurs bien connue (Nunes-Nesi et al., 2005; Dobrotá, 2006; Hashida et al., 2009). En conditions de stress, la plante puise dans son métabolisme énergétique alors que souvent la production énergétique est déjà affectée. En deçà d'un certain seuil, la croissance s'arrête, des lésions apparaissent et s'accumulent, pouvant conduire à la mort du végétal. Même si c'est la photosynthèse qui est à l'origine des squelettes carbonés et qui conditionne la productivité des plantes, c'est la respiration cellulaire qui convertit le carbone fixé en énergie qui est utilisée pour la croissance et le développement des plantes. Dans ces flux énergétiques le principal porteur rédox est le NAD. Cinq molécules d'ATP sont nécessaires à sa biosynthèse à partir de l'aspartate et au maximum trois sont requis pour son recyclage (Noctor et al., 2006; Hashida et al., 2009). Pour avoir une croissance et un développement normaux, les plantes contrôlent étroitement leurs niveaux de NAD (Titok et al., 1995; Wang & Pichersky, 2007). Lorsqu'elles sont exposées à des conditions environnementales conduisant à des stress oxydants, les PARP sont induites, consomment de grandes quantités de NAD et pourraient même moduler l'activité d'enzymes du métabolisme énergétique (De Block et al., 2005; Andrabi et al., 2014). Le maintien de l'homéostasie énergétique des plantes est probablement assuré par un contrôle de l'activité des PARP, une activation des voies de recyclage du NAD et une modulation du métabolisme respiratoire (Amor et al., 1998; Dutilleul et al., 2003a; De Block et al., 2005; Hauben et al., 2009). En somme, une amélioration de l'homéostasie énergétique diminue la consommation nette énergétique lorsque les plantes sont soumises à des conditions défavorables. Cela

rapproche les plantes de leur potentiel de rendement, leur permet d'être plus flexibles face aux conditions environnementales et minimise les pertes (**Figure 25**). Cependant, le contenu énergétique des plantes n'est pas le seul facteur déterminant la productivité des plantes, puisqu'une large gamme de voies métaboliques est régulée par les teneurs et l'état rédox des nucléotides à pyridine et leurs dérivés et que d'autres mécanismes senseurs de l'état énergétique comme la kinase SnRK1 régulent la transcription des gènes du métabolisme énergétique (Baena-González & Sheen, 2008). L'homéostasie et l'efficacité énergétique sont ainsi des déterminants majeurs du rendement des cultures. L'optimisation du métabolisme énergétique permettrait d'accroître les rendements actuels et potentiels des cultures (**Figure 25**). On peut se demander si des caractères aussi complexes que le rendement des plantes sont modifiables par la sur/sous expression de quelques voire d'un seul gène. Pour autant, certaines approches reposant sur l'expression d'un gène unique ont permis d'améliorer par exemple la résistance à la sécheresse (Yang et al., 2010) où la qualité nutritionnelle des grains (Avraham et al., 2005).

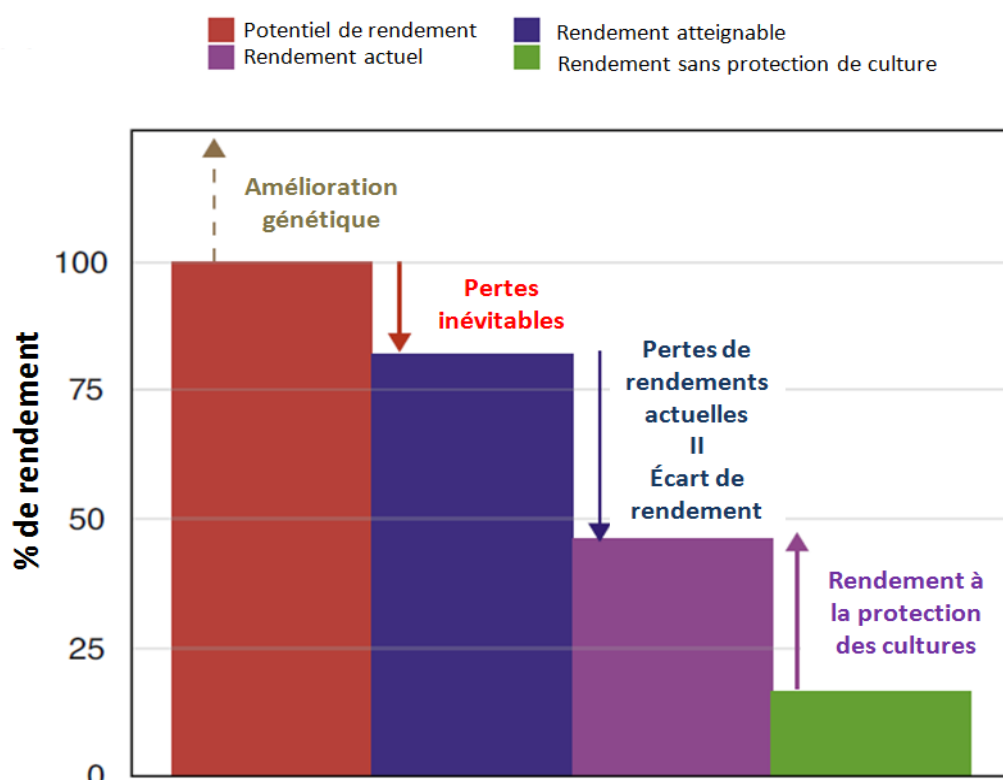


Figure 25. Les différents types de rendement et l'écart de rendement (D'après De Block & Van Lijsebettens, 2011).

Objectifs du travail de thèse

Les données mentionnées précédemment font ressortir le NAD comme le métabolite « master », contrôlant l'homéostasie énergétique des plantes, contribuant à leur productivité ainsi qu'à leur résistance aux stress. Ceci reste néanmoins à démontrer, tant au laboratoire qu'en plein champ.

L'état de la littérature pointe les voies de biosynthèse *de novo* et l'utilisation par les PARP comme éléments régulateurs principaux des teneurs en NAD(P) chez les plantes. Chez le tabac, la production de nicotine, dérivé du NAD et conditionnée par le niveau d'activité de la QPT, il a dans un premier temps été envisagé de surproduire cette enzyme au laboratoire. D'autres équipes ont ciblé les enzymes NaMNAT et NAD kinases avec des résultats mitigés. La surexpression ectopique de la QPT au laboratoire a permis de surproduire de manière inductible du NAD dans des tissus végétaux mais dans des conditions non physiologiques, ne permettant pas d'en mesurer l'impact sur la productivité des plantes. Néanmoins, ces travaux ont démontré que le NAD était impliqué dans une signalisation dépendante de l'acide salicylique dans la défense des plantes faces aux agents pathogènes. La surproduction constitutive de la QPT dans son compartiment d'adressage naturel chez *Arabidopsis thaliana* n'a pas permis d'augmenter de manière significative les niveaux en NAD, laissant penser qu'une étape limitante en amont de la voie de biosynthèse *de novo* ou d'une des voies de recyclage contrôlerait la production du NAD chez les plantes. Effectivement, comme c'est le cas pour de nombreuses voies métaboliques, et à l'instar de ce qui se passe chez les bactéries dont la voie de biosynthèse *de novo* est similaire à celle des plantes, la première étape de la voie catalysée par l'aspartate oxydase (AO), semble exercer un contrôle de la production de NAD par les plantes. Les données transcriptomiques suggèrent une forte implication de cette enzyme en situation de stress et pour certains besoins développementaux (croissance des tubes polliniques), qui peuvent engendrer de fortes consommations de NAD. C'est pourquoi j'ai pensé réalisable de moduler les teneurs en NAD chez les plantes en ciblant cette étape enzymatique par des approches de génétique inverse.

Une fois générées les lignées de plantes d'*Arabidopsis* aux teneurs en NAD constitutivement dérégulées, celles-ci seront caractérisées tant physiologiquement que biochimiquement en conditions optimales de croissance et en situation de stress. Cette approche permettra, outre de cerner l'importance de l'aspartate oxydase dans le contrôle de l'homéostasie énergétique des plantes, d'étudier de manière ciblée l'impact d'une dérégulation des niveaux de NAD chez *Arabidopsis thaliana*. Les plantes obtenues permettront de vérifier comment les teneurs en NAD impactent le métabolisme énergétique, les grandes fonctions du métabolisme primaire, la croissance et le développement des plantes et leur résistance aux contraintes de l'environnement.

Résultats

Résultats

Chapitre I

Obtention de plantes d'*Arabidopsis thaliana* aux teneurs en NAD constitutivement altérées

Nous avons décidé ici de tester la potentialité de la L-aspartate oxydase (AO) à contrôler la biosynthèse du NAD, en transformant *Arabidopsis thaliana* avec une séquence codante de cette enzyme sous contrôle d'un promoteur fort constitutif, et aussi en obtenant des lignées mutantes d'insertions ADN-T pour le gène de l'AO. Nous avons réalisé une sélection des plantes suivie d'une brève caractérisation moléculaire et biochimique. Cela nous a permis d'avoir à disposition les outils biologiques répondant à la stratégie envisagée dans cette thèse pour altérer constitutivement les teneurs en NAD chez les plantes.

I- Production et caractérisation moléculaire des lignées transgéniques dérégulées pour la production d'AO chez *Arabidopsis thaliana*

A- Obtention de plantes mutantes d'*Arabidopsis thaliana* homozygotes pour l'insertion de l'ADN-T dans le gène AO

Les lignées SAIL_1145_B10 (lignée *mAO1*) et SALK_013920C (lignée *mAO2*) mutantes ADN-T portant l'insertion dans le dernier exon de la séquence codante du gène de la L-aspartate oxydase (AO, numéro d'accèsion *At5g14760*), ont été obtenues dans un fond génétique Columbia, à partir respectivement de la collection de Syngenta Biotechnology, Research Triangle Park, USA (SAIL pour « Syngenta Arabidopsis Insertion Library ») (Sessions et al., 2002) et de celle du Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, San Diego, USA (Alonso et al., 2003) (**Figure 26 a**). Les mutants homozygotes pour ces insertions ADN-T, notés *mAO1* et *mAO2*, ont été identifiés par criblage PCR sur ADN génomique extrait de plantules âgées de 15 jours (**Figure 26**). La présence des ADN-T a été vérifiée en utilisant les

couples d'amorces *LPmAO1/LBSAIL* et *LPmAO2/LBb1.3* (allèles muté, bord gauche de l'ADN-T) (**Figure 26**), les amorces *LBSAIL* et *LBb1.3* s'hybridant sur l'ADN-T et les amorces *LPmAO1* et *LPmAO2* étant spécifiques au gène de l'AO. D'après la **Figure 26 b & c**, seules les lignées *mAO1* et *mAO2* présentent une bande d'amplification de respectivement 750 pb et 500 pb, confirmant l'insertion de l'ADN-T dans le génome. Les couples *LPmAO1/RPmAO1* et *LPmAO2/RPmAO2* (allèles sauvages) permettent quant à eux de tester l'intégrité du gène endogène *At5g14760*. Avec ces deux couples d'amorces, une bande de 1100 pb est observée uniquement chez les plantes sauvages notées Ctrl. Ce produit d'amplification est absent chez les deux mutants *mAO1* et *mAO2*, confirmant leur état homozygote (**Figure 26 b & c**).

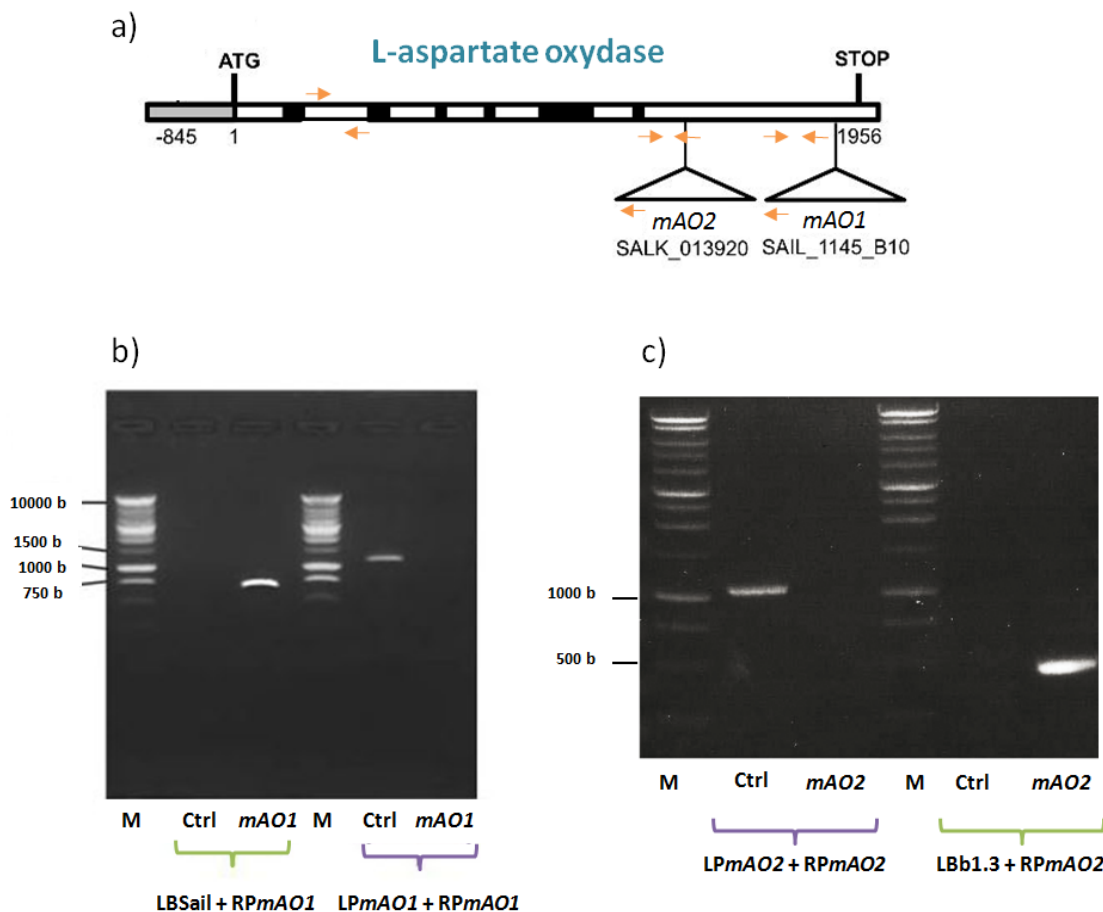


Figure 26. Caractérisation moléculaire des mutants homozygotes d'insertion ADN-T pour la L-aspartate oxydase. a) Carte du gène codant pour la L-aspartate oxydase, et position de l'ADN-T inséré dans le mutant de la lignée SALK_013920C et SAIL_1145_B10. b) Gel d'agarose 0,8 % de génotypage du mutant *mAO1*. *LPmAO1*, amorce sens ; *RPmAO1*, amorce reverse ; *LBSail*, amorce s'hybridant sur l'ADN-T. M. marqueur de poids moléculaire. c) Gel d'agarose 0,8 % de génotypage du mutant *mAO2*. *LPmAO2*, amorce sens ; *RPmAO2*, amorce reverse ; *LBb1.3*, amorce s'hybridant sur l'ADN-T ; M. marqueur de poids moléculaire.

B- Surexpression constitutive de l'ADNc codant l'AO d'*Arabidopsis thaliana*

L'ADNc (séquence codante, CDS) d'*Arabidopsis thaliana* codant pour la L-aspartate-oxydase (L-AO) (**ANNEXE 1**) a été amplifié par PCR avec les amorces de séquences suivantes : amorce sens (GAG AGA CCC GGG ATG GCG GCT CAT GTT TCT AC) ; amorce reverse (GAG AGA CAG CTG AAT CGT TAG TTA TTC ACT CGA C). L'amplifiat a ensuite été sous-cloné entre les sites Sma1 et Sal1 du vecteur pCW162 binaire (**Figure 27**), sous le contrôle du promoteur CaMV35S, pour générer des plantes transgéniques sur-exprimant la L-aspartate oxydase. La cassette nptII de pCW162 a été utilisée pour la sélection des plantes transgéniques sur milieu contenant de la kanamycine. Le plasmide résultant a ensuite été utilisé pour la transformation stable de plantes d'*Arabidopsis thaliana* pour surexprimer le gène L-AO, en utilisant la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Les transformants primaires ont été sélectionnés sur milieu Murashige et Skoog contenant 50 mg.l⁻¹ de monosulfate de kanamycine. Après environs 10 jours de culture *in vitro* (23°C, sous intensité lumineuse de 100 µmoles de photons.m⁻².s⁻¹), les plants résistants ont été transférés sur pot de terreau en chambre de culture jours longs (LD, régime jour/nuit de 16h/8h) afin d'obtenir des graines qui ont subi un nouveau régime de sélection. Le nombre de plantes transgéniques putatives a été noté pour sélectionner les lignées qui ont inséré une seule copie du transgène (rapport ¾ non-résistants, ¼ résistants). Les descendants ont été sélectionnés jusqu'à obtention de lignées stables homozygotes pour l'insertion ADN-T.

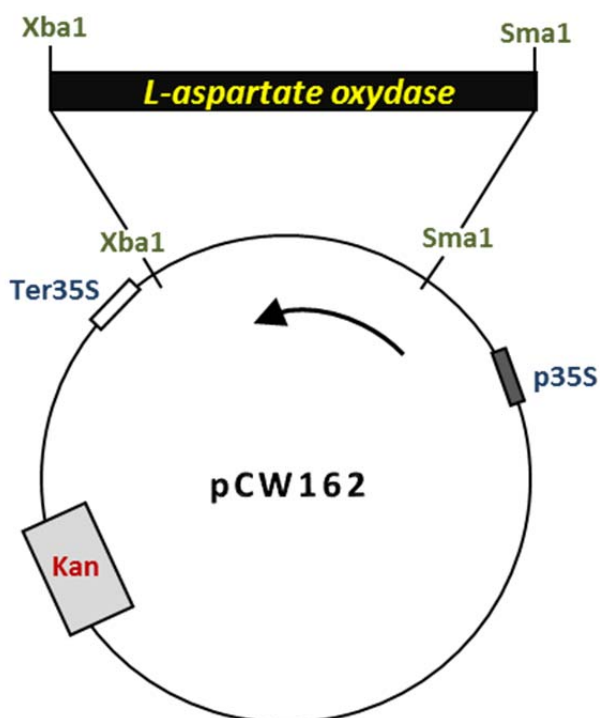


Figure 27. Représentation schématique du vecteur utilisé pour la transformation des plantes PCW162- gène AO. Construction utilisée pour l'obtention des plantes transgéniques 35S::AO. La séquence codante du gène AO a été clonée entre les sites de restriction Xba1 et Sma1, eux mêmes placés entre le promoteur (p35S) et le terminateur (Ter35S) du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) présents dans le vecteur binaire pCW162. Les transformants sont résistants à la kanamycine (Kan).

C- Les niveaux de transcrits AO mesurés chez *mAO1* et *mAO2* sont drastiquement réduits

L'expression du gène de la L-aspartate oxydase a été examinée par qRT-PCR avec les amorces des séquences suivantes : amorce sens (GAT CGT TCA CCG TGC TGA TA) et amorce reverse (TGT GTT CAA GCC ATC CTG AG, conçues à partir de la séquence de l'ADNc correspondante (**Figure 28**). Une méthode de quantification relative a été appliquée en utilisant le gène ACT2 comme gène de référence. Les résultats, exprimés en pourcentage d'expression relative par rapport au Ctrl, indiquent une diminution drastique du niveau des messagers AO chez les mutants *mAO1* et *mAO2* par rapport au Ctrl (**Figure 28**). L'expression du gène AO n'est cependant pas nulle dans aucun des mutants, puisque nos données révèlent un niveau résiduel de l'ordre de 20 à 40 % chez ceux-ci (**Figure 28**).

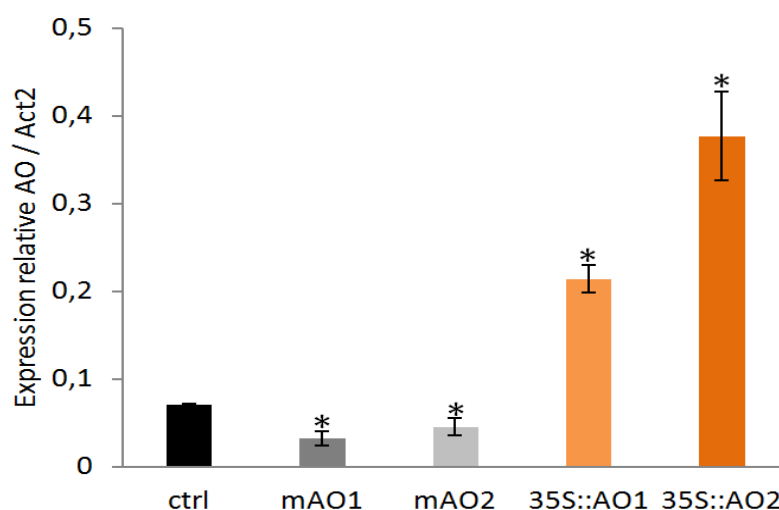


Figure 28. Mesure des niveaux de transcrits L-aspartate oxydase relatif à l'actine2 (Act2). Ctrl : lignée contrôle, *mAO1* : mutant d'insertion homozygote ADN-T pour la L-aspartate oxydase, lignée SAIL_1145_B10, *mAO2* : mutant d'insertion homozygote ADN-T pour la L-aspartate oxydase, lignée SALK_013920C, 35S::AO1 et 35S::AO2, lignées surexprimant l'AO. Les valeurs représentent les moyennes d'au moins trois séries de mesures indépendantes \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

D- Les lignées surexpresser 35S::AO ont des niveaux de transcrits AO fortement augmentés

Selon la procédure de qRT-PCR précitée, une mesure du niveau de transcrits spécifiques AO a été effectuée, et indique que les lignées surexpresser 35S::AO présentent toutes des niveaux de messages AO augmentés. Les lignées 35S::AO1 et 35S::AO2 (**Figure 28**) ont été retenues pour la suite de notre étude car elles présentent les plus hauts niveaux d'expression du gène AO (respectivement 40 et 20 fois plus).

II- Caractérisation biochimique des lignées sur- et sous-produisant l'AO

L'utilisation de techniques de génétique inverse nous a permis d'obtenir des plantes d'*Arabidopsis thaliana* aux niveaux d'expression de l'AO dérégulés. Nous avons alors mis au point une méthode originale permettant de mesurer chez ces plantes les contenus en AO.

A- L'activité AO est corrélée à celle des transcrits chez les lignées transformées

A l'exception d'un exemple controversé dans lequel les auteurs attribueront ultérieurement leurs résultats à une activité glutamate-oxaloacétate transaminase (Hosokawa Y et al., 1983; Wilder et al., 1984), il n'existe aucune donnée de la littérature décrivant la mesure de l'activité AO chez des plantes. En effet, nous avons dans un premier temps réalisé des essais sur extraits de plantes basés sur des protocoles de mesure appliqués à l'AO bactérienne (Tedeschi et al., 2001; Rousset, 2009), qui se sont avérés infructueux (réduction du cytochrome C ou oxydation de l'O-dianisidine). Nous avons donc opté pour une méthode de dosage par du phénolate de sodium et du nitroprussiate en spectrophotométrie à 635 nm, qui permet de révéler l'ammonium libéré par le produit de la réaction, l'iminoaspartate, qui est instable en solution aqueuse à pH physiologique (**Figure 29**). Un protocole détaillé de mesure est décrit dans la section intitulée « Matériels & Méthodes » plus après. Celui-ci a été inclus à la proposition de brevet déposé par le CNRS le 24 février 2014 auprès de l'INPI (de Bont & Gakière, 2014). Comme attendu, l'activité extractible *in vitro* de l'AO suit la même tendance que le niveau d'expression du gène correspondant. Effectivement, l'activité AO extractible baisse fortement chez le mutant *mAO*, mais il subsiste une activité résiduelle d'environ 50% (de 15 nmoles

d'iminoaspartate.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines ; **Figure 29**). La présence résiduelle de transcrits AO et d'activité enzymatique de l'AO chez ces mutants ADN-T homozygotes suggère que ces derniers sont des knock-down et non des knock-out. A l'inverse, les lignées transformées 35S::AO présentent une activité de la L-aspartate oxydase augmentée de 2 à 3 fois (jusqu'à 73 nmoles d'iminoaspartate.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines ; **Figure 29**).

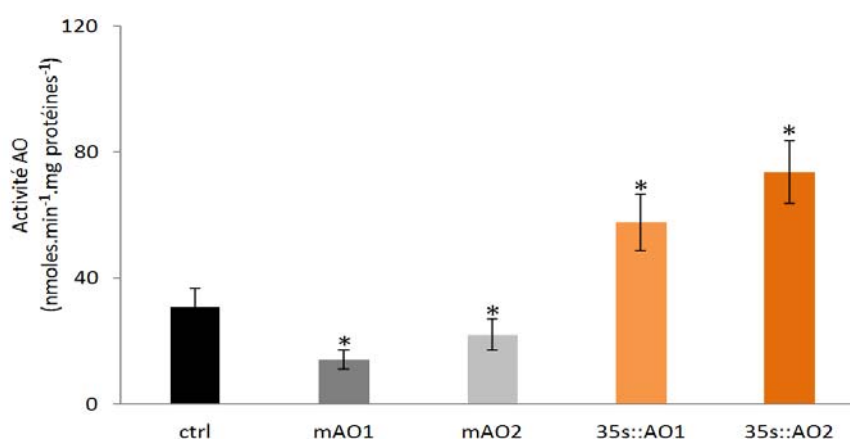


Figure 29. Mesure de l'activité enzymatique AO à partir d'extraits foliaires. Ctrl : lignée contrôle, *mAO1* : mutant d'insertion homozygote ADN-T pour la L-aspartate oxydase, lignée SAIL_1145_B10, *mAO2* : mutant d'insertion homozygote ADN-T pour la L-aspartate oxydase, lignée SALK_013920C, *35S::AO1* et *35S::AO2*, lignées surexprimant l'AO. Les valeurs représentent les moyennes d'au moins trois séries de mesures indépendantes \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

B- La production de L-aspartate oxydase conditionne les teneurs en NAD et en ATP chez Arabidopsis thaliana

Les résultats présentés ci-dessus montrent que nous avons obtenus des lignées de plantes mutantes dont la quantité d'AO est modifiée. En dérégulant de façon constitutive la production d'AO, nous visions à obtenir des plantes constitutivement altérées dans les niveaux stationnaires et les flux de synthèse de nucléotides à pyridine. Les données de la littérature montrent une dynamique des teneurs en NAD⁺ tout au long de la croissance des plantes (Queval & Noctor, 2007; Wang & Pichersky, 2007) (**Figure 23**).

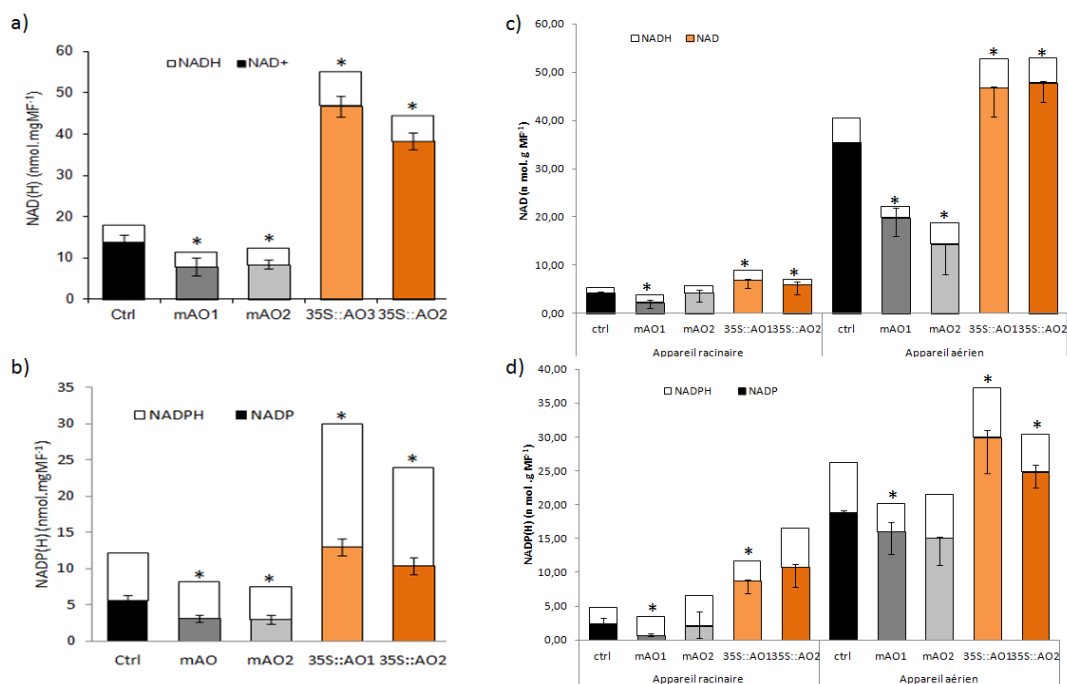


Figure 30. Mesure des pools libres intracellulaires de nucléotides à pyridine. a) Pool de NAD⁺ et de NADH ; b) NADP⁺ et NADPH. Ctrl : lignée contrôle, *mAO1* : mutant d'insertion homozygote ADN-T pour la L-aspartate oxydase, lignée SAIL_1145_B10, *mAO2* : mutant d'insertion homozygote ADN-T pour la L-aspartate oxydase, lignée SALK_013920C, *35S::AO1* et *35S::AO2*, lignées surexprimant l'AO. Les valeurs représentent les moyennes d'au moins cinq séries de mesures indépendantes ± l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à P < 0,05 pour le test t de Student.

Au cours de la croissance des plantes, les niveaux de NAD⁺ augmentent puis se stabilisent au bout de 25 à 30 jours courts (photopériode 8 h lumière), selon le stade de développement considéré (**Figure 23**). Une analyse du pool de nucléotides à pyridine cellulaires libres a été réalisée sur des échantillons foliaires provenant de plantes cultivées pendant 35 jours en chambre de culture *Jours Courts*, afin de se placer dans des conditions où le pool de NAD présente le plus fort différentiel entre les lignées étudiées. La mesure des teneurs en NAD(H) montre une diminution de moitié chez les mutants *mAO* par rapport au *Ctrl* (**Figure 30**). On observe la même tendance pour le pool de NADP(H) avec aussi une forte baisse de l'ordre de 40% chez les mutants *mAO* (**Figure 30**). Ces observations sont faites aussi bien dans les feuilles de plantes cultivées sur terreau que sur feuilles et racines de plantes cultivées en hydroponique (**Figure 30**). Ainsi, en diminuant le niveau d'AO endogène, on obtient des plantes ayant deux fois moins de NAD/P(H). Concernant les lignées surproduisant l'AO, celles-ci montrent un fort enrichissement en

nucléotides à pyridine, jusqu'à trois fois les teneurs mesurées chez les plantes Ctrl (**Figure 30**), sans modification de l'état rédox NAD^+/NADH et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. En faisant augmenter le niveau d'AO endogène, on peut obtenir des plantes aux niveaux de NAD(P)/H fortement augmentés. Ces mesures montrent que la stratégie adoptée pour déréguler de manière constitutive les niveaux de NAD est un succès.

Puisque la synthèse du glutathion est couplée à l'utilisation du NADPH (Foyer & Noctor, 2012) (**Figure 31**), nous avons quantifié les niveaux intracellulaires de glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) dans les différentes lignées. La **Figure 31** montre une légère diminution du pool de glutathion total (GSH + GSSG) chez les mutants *mAO* par rapport au Ctrl, accompagné d'une augmentation légère des niveaux de glutathion oxydé (GSSG), traduisant un possible stress oxydatif à la lumière dans les conditions de culture de l'étude. Par contre, chez les plantes surexprimant l'AO on ne constate aucune modification significative des teneurs et de l'état rédox du glutathion (**Figure 31**).

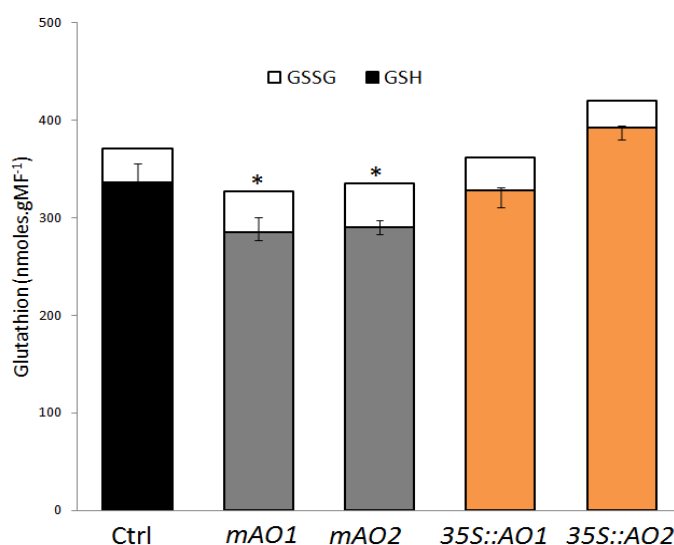


Figure 31. Mesure des pools intracellulaires de glutathion. GSSG, glutathion oxydé ; GSH, glutathion réduit. Ctrl : lignée contrôle, *mAO1* : mutant d'insertion homozygote ADN-T pour la L-aspartate oxydase, lignée SAIL_1145_B10, *mAO2* : mutant d'insertion homozygote ADN-T pour la L-aspartate oxydase, lignée SALK_013920C, *35S::AO1* et *35S::AO2*, lignées surexprimant l'AO. Les valeurs représentent les moyennes d'au moins cinq séries de mesures indépendantes. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

Une autre molécule du métabolisme énergétique, l'ATP, dont la synthèse est permise par l'oxydation du NAD(P)H sur la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et par la photolyse de l'eau dans les plastes, a été mesurée dans l'ensemble des lignées (**Figure 32**). On constate une diminution significative, de l'ordre de 20%, des teneurs en ATP dans les lignées mutantes sous-produisant l'AO et le NAD, alors qu'une augmentation de 25% est constatée chez les lignées 35S::AO surproductrices de NAD. Les variations des pools libres stationnaires de NAD impactent donc les teneurs en ATP chez *Arabidopsis thaliana*.

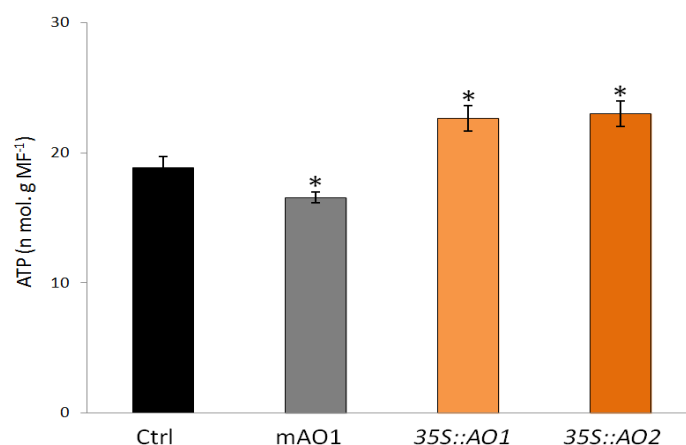


Figure 32. Mesure des pools intracellulaires d'ATP. Ctrl : lignée contrôle, *mAO1* : mutant d'insertion homozygote ADN-T pour la L-aspartate oxydase, lignée SAIL_1145_B10, *mAO2* : mutant d'insertion homozygote ADN-T pour la L-aspartate oxydase, lignée SALK_013920C, *35S::AO1* et *35S::AO2*, lignées surexprimant l'AO. Les valeurs représentent les moyennes de trois séries de mesures indépendantes \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les *Ctrl* et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

III- Les teneurs en NAD conditionnent le phénotype morphologique des lignées mutantes

L'observation du phénotype morphologique des lignées mutantes ici analysées a été réalisée sur des plantes du même stade que celles pour lesquelles ont été faits les prélèvements foliaires utilisés pour la mesure des métabolites énergétiques NAD et ATP, afin de pouvoir corrélérer les niveaux de métabolites énergétiques avec l'aspect morphologique des plantes. Aux plantes cultivées sur terreau, nous avons ajouté une analyse de la croissance des lignées après semis sur milieu $\frac{1}{2}$ MS qui permet de mettre en évidence les éventuels phénotypes racinaires.

Les mutants *mAO* aux teneurs en NAD diminuées présentent un retard de croissance des parties aériennes et une modification de leur morphologie par rapport aux lignées sauvages (**Figure 33**). Les plantes *mAO* sont aussi légèrement plus pâles, suggérant une altération des niveaux des pigments photosynthétiques. Les plantes surproduisant l'AO et riches en métabolites énergétiques (NAD et ATP) sont plus grosses et ont plus de feuilles au même nombre de jours de culture par rapport aux plantes sauvages (**Figure 33**).



Figure 33. Photographie représentative des plantes contrôles (Ctrl), des plantes mutantes homozygotes d'insertion ADN-T pour la L-aspartate oxydase, (*mAO*) ici *mAO1* et des plantes surexpresses de l'AO (*35S::AO*), ici *35S::AO1*. Les plantes sont cultivées sur terreau pendant 35 jours, en conditions de jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$.

L'analyse de la croissance racinaire effectuée sur boîtes verticales de milieu demi-MS (Murashige & Skoog, 1962). Deux semaines après semis, un fort différentiel de croissance est observé entre les trois lignées (**Figure 34**). Les mutants *mAO* se caractérisent par une très faible croissance de l'appareil racinaire par rapport aux plantes sauvages, avec une diminution moyenne de la longueur de la racine principale de l'ordre de 50 %. A l'inverse, l'appareil racinaire des lignées surproduisant l'AO et riches en NAD est plus développé que celui des plantes sauvages, la racine principale étant plus longue de 30% environ et les racines

latérales étant plus précocement développées (**Figure 34**). Une analyse plus complète des altérations développementales et de croissance des lignées sera présentée dans le chapitre suivant.

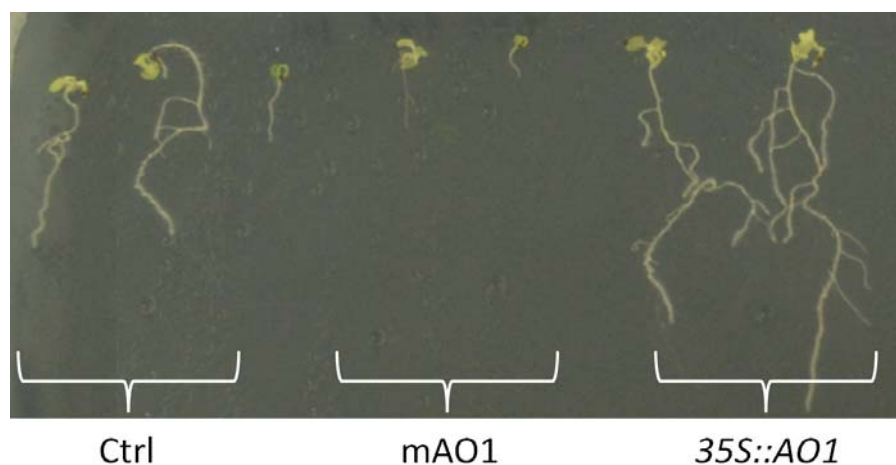


Figure 34. Photographie représentative des plantes contrôles (Ctrl), des plantes mutantes homozygotes d'insertion ADN-T pour la L-aspartate oxydase, (*mAO*) ici *mAO1* et des plantes surexpresses de l'AO (*35S::AO*), ici *35S::AO1* cultivées sur milieux Murashige & Skoog pendant 15 jours, en conditions de jours longs (photopériode 16h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons.m}^2.\text{s}^{-1}$.

IV- Discussion

La manipulation des voies de biosynthèse du NAD chez les plantes constitue un moyen d'analyser de manière ciblée l'impact des teneurs intracellulaires en NAD sur les fonctions métaboliques, physiologiques, développementales et de signalisation cellulaire. Pour autant, aucun des travaux réalisés jusqu'ici n'a permis d'augmenter ou d'abaisser fortement et de manière constitutive et ciblée les teneurs en NAD chez les plantes (Chai et al., 2005; Schippers et al., 2008; Hashida et al., 2010; Takahara et al., 2010; Pétriacq, 2011; Pétriacq et al., 2012), sans doute parce que les étapes enzymatiques dérégulées n'exerçaient pas un contrôle suffisant sur la production de NAD. La stratégie que nous avons choisie a cependant bénéficié des travaux antérieurs, notamment ceux portant sur la surexpression de la QPT, qui suggèrent une limitation de la fourniture en substrat sur la voie de biosynthèse en amont de l'enzyme dérégulée (Pétriacq, 2011). Nous avons aussi bénéficié de diverses données transcriptomiques suggérant que la première étape de la voie dite

de novo, catalysée par la L-aspartate oxydase, était sujette à une forte régulation transcriptionnelle en réponse aux contraintes de l'environnement chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

A- Les mutants *mAO* homozygotes pour le gène de l'AO sont non létaux

Les travaux réalisés dans ce chapitre démontrent qu'il est possible d'obtenir chez *Arabidopsis thaliana* des mutants homozygotes pour l'insertion d'un ADN-T dans la séquence codante du gène de l'AO. La caractérisation des lignées *mAO1* et *mAO2* indique que la mutation par insertion d'ADN-T est délétère pour le gène (**Figure 26**), ce qui s'accompagne de niveaux réduits mais non nuls de transcrits spécifiques AO (**Figure 28**). L'activité AO chez les mutants est également fortement diminuée (**Figure 29**) et les niveaux de NAD sont diminués du même ordre.

Katoh et al. (2006) ont montré chez des mutants d'insertion de transposons que l'état homozygote pour les trois premiers gènes codant les enzymes de la voie de synthèse du NAD (*i.e.* AO, QS et QPT) entraînait une létalité embryonnaire chez *Arabidopsis thaliana*. Hashida et al. (2007) rapportent la même observation pour le gène de la NaMNAT. Par ailleurs, ces auteurs ne rapportaient pas de phénotype sur les mutants à l'état hétérozygote, à l'exception des mutants NaMNAT chez lesquels la germination du pollen était affectée (Hashida et al., 2007). Nos observations diffèrent fortement des résultats de ces auteurs puisque nous avons obtenu des mutants d'insertion ADN-T homozygotes pour le gène AO qui sont viables, malgré un phénotype développemental caractérisé principalement par un retard de croissance des parties aériennes et racinaires. Récemment, Macho et al (2012) ont étudié le mutant *mAO1* également à l'état homozygote lors d'un criblage de mutants insensibles à la flagelline. Ces auteurs n'ont pas rapporté de phénotype hormis un léger retard de développement mentionné dans les données supplémentaires de leur article. Peut-être les auteurs ont-ils voulu minimiser l'impact de la mutation sur la croissance, cet aspect ne correspondant pas à l'objet de leur étude. La non-létalité observée chez les mutants *mAO* peut s'expliquer en partie par un niveau résiduel de transcrits AO, associé à une activité enzymatique seulement réduite de moitié. Vraisemblablement, la mutation par insertion d'ADN-T limiterait fortement l'expression des transcrits et pourrait aussi déstabiliser les messagers AO. Une

version probablement tronquée des transcrits semble produire cependant une protéine fonctionnelle, contribuant ainsi à synthétiser l'iminoaspartate indispensable à la biosynthèse *de novo* de NAD (**Figure 30**). En effet, l'insertion des ADN-T se situe dans le dernier exon du gène de l'AO, à l'extrémité C-terminale de la protéine, dans une zone peu conservée entre les différentes espèces bactériennes et de plantes (Noctor et al., 2006) (**Figure 26**). Il en résulte probablement une protéine tronquée en extrémité C-terminale, mais qui reste active (**Figure 29**). Cette insertion aurait pour effet principal d'abaisser drastiquement le niveau de transcrits jusqu'à 80 %. En effet, les messagers tronqués n'ont probablement pas de queue polyA où ont une séquence anormale accélérant leur dégradation.

On pourrait aussi imaginer que l'effet de la mutation du gène de l'AO soit compensé par l'accumulation du substrat de la réaction, l'aspartate. Il n'en est rien, comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit dans le chapitre IV. On ne peut pas exclure cependant l'existence d'autres voies métaboliques induites permettant de compenser la baisse de synthèse *de novo*. Il peut s'agir soit d'une activation d'une des voies dites de recyclage. Par exemple, chez un mutant de la quinolinate synthase (QS), il a été rapporté une augmentation légère des niveaux de NAD qui serait liée à la surexpression d'une isoforme de NaPT de la voie de recyclage principale du NAD, ainsi que de la surexpression du gène codant l'AO (Schippers et al., 2008). Ou Il peut s'agir de l'induction d'une voie de biosynthèse du quinolinate dérivée du tryptophane, comme cela a pu être suggéré chez le tabac et le maïs (Henderson et al., 1959; Arditti & Tarr, 1979). Même si les travaux ultérieurs menés sur ces plantes ont démontré que la biosynthèse *de novo* s'effectuait bien à partir de l'aspartate sur des plantes adultes, il n'est pas exclu que sur des graines en germination une biosynthèse du NAD soit initiée à partir du tryptophane.

B- La mise au point d'un test d'activité AO in planta a permis de quantifier la production d'AO dans les plantes

Dans le but d'une caractérisation exhaustive de mutants altérés pour leur production d'AO, il nous a été indispensable de mettre au point une méthode permettant de mesurer la quantité d'enzyme AO produite par ces plantes. L'une des difficultés majeures généralement rencontrée pour mesurer des activités

enzymatiques à partir d'extraits de plantes par rapport à des mesures faites à partir d'enzymes purifiées, est de mettre au point un test enzymatique de sensibilité suffisante. Or nous n'avions à disposition que des protocoles de mesure de l'activité AO sur enzyme bactérienne purifiée (Tedeschi et al., 2001; Marinoni et al., 2008; Rousset, 2009). Cependant, il existait au laboratoire une méthode proche d'un des protocoles de mesure des activités oxydase bactérienne et qui s'appliquait avec succès à la glycolate oxydase (Younes Dello, communication personnelle). Nous avons donc engagé différents tests d'activité à partir d'extraits foliaires d'*Arabidopsis thaliana* en appliquant les méthodes de mesures habituellement réalisées pour les bactéries, c'est-à-dire par couplage soit avec l'O-dianisidine, soit avec du cytochrome C, en présence et en absence de fumarate. Ces tests avaient l'avantage de mesurer l'activité oxydase sans passer par une mesure du produit de la réaction, l'iminoaspartate, instable en solution. Les difficultés rencontrées à mesurer l'activité AO avec ces protocoles nous ont fait opter pour une méthode de dosage d'un des produits de dégradation de l'iminoaspartate, l'ammonium.

Les mesures des activités AO chez les lignées mutantes *mAO* et surproduisant l'AO confirment bien la sous-production et la sur-production de la protéine dans les lignées respectives. Ces résultats indiquent aussi que la séquence nucléotidique d'*Arabidopsis thaliana* utilisée pour la transformation des plantes où interrompue dans les mutants d'insertions, et qui est homologue de celle de la L-aspartate oxydase bactérienne caractérisée dans la littérature, correspond bien à une activité L-aspartate oxydase, mais fonctionnant selon un mécanisme similaire à celui utilisé par les bactéries en anaérobiose. Cette observation est en accord avec la présence possible de fumarate au sein du compartiment plastidial (Woo, 1983).

Les résultats indiquent une étroite corrélation entre les niveaux d'AO et ceux de NAD dans les plantes étudiées. Par contre, les niveaux de transcrits, s'ils sont en accord avec les tendances mesurées pour le NAD et l'activité AO, n'en demeurent pas moins d'un autre ordre de grandeur dans les plantes surexprimant l'AO sous contrôle d'un promoteur fort et constitutif. En effet, autant pour les mutants aux activités AO et niveau de NAD diminués de moitié, les niveaux de messagers sont diminués de 60 à 80%, soit du même ordre de grandeur, autant chez les lignées *35S::AO*, aux niveaux de NAD et d'activité augmentés de deux à trois fois par rapport aux plantes contrôles, les niveaux de transcrits sont augmentés de 20 à 40 fois. Cela

suggère fortement une régulation soit de l'activité, soit de la traduction protéique par le NAD ou l'un des dérivés de la voie de biosynthèse du NAD. En effet chez les bactéries, le NAD⁺ est un inhibiteur compétitif de l'AO en se fixant sur le domaine de liaison au FAD, à des doses proches des teneurs physiologiques (1 à 3 mM), alors que le NADP⁺ a un effet inhibiteur beaucoup moins prononcé (Griffith et al., 1975; Nasu et al., 1982). Or dans les plantes, en particulier dans les chloroplastes où l'enzyme est localisée, les teneurs en NAD varient d'environ 0,2 mM le jour à près de 1 mM à l'obscurité. En raison de la forte homologie de séquences entre protéines bactériennes et de plantes, avec une totale conservation des résidus d'acides aminés intervenant dans l'activité catalytique de la protéine, on peut imaginer que l'enzyme de plante soit aussi inhibée par les teneurs en NAD⁺, en particulier à l'obscurité, adaptant la production de NAD au moindre besoin d'utilisation de ce métabolite la nuit.

C- L'AO exerce un contrôle clef sur la production de NAD et l'homéostasie énergétique des plantes

Comme nous venons de le voir, la caractérisation des lignées *mAO* et *35S::AO* révèle une forte altération de leurs niveaux de nucléotides à pyridine et montre aussi une modification des niveaux d'ATP qui suivent la même tendance. Ces observations, combinées à celles des bases de données ou de la littérature qui suggèrent une forte régulation transcriptionnelle de l'AO dans certaines conditions environnementales, témoignent du rôle pivot qu'exerce l'enzyme dans l'homéostasie énergétique des végétaux supérieurs. Cela n'est pas surprenant car l'AO catalyse la première étape de la voie de biosynthèse dite *de novo*. Or il est courant que la première étape d'une voie métabolique soit sujette à un fort contrôle. Cette observation est à mettre en parallèle avec la voie de biosynthèse du NAD chez les bactéries, dont les étapes enzymatiques sont similaires, et chez laquelle l'AO est soumise tant à un contrôle biochimique que transcriptionnel par les niveaux de NAD. Mais dans ce dernier cas, c'est tout un opéron qui répond au contrôle transcriptionnel de la voie par le facteur de transcription NadR qui fixe le NAD (Penfound & Foster, 1999). L'existence d'un gène unique (*At5g14760*) codant pour l'AO chez *Arabidopsis thaliana* témoigne aussi de la forte pression de sélection exercée sur cette étape enzymatique au cours de l'évolution.

Les études précédentes menées au laboratoire ont montré qu'il était possible, de manière inductible en fournissant le substrat de l'enzyme de biosynthèse QPT d'*E. coli* surexprimée dans les tissus végétaux, de surproduire du NAD (Pétriaccq et al., 2012). Mais une surproduction constitutive de l'enzyme dans son compartiment d'adressage naturel et sans infiltration du substrat de l'enzyme à des plantes n'a pas permis d'obtenir de fortes augmentations des teneurs en NAD (Pétriaccq, 2011). Cela valide l'hypothèse selon laquelle l'AO est bien l'étape limitante dans la biosynthèse du NAD par les plantes. Toutefois, cette conclusion n'exclut pas le rôle déterminant que peuvent jouer les autres étapes de la voie de biosynthèse dans le contrôle des niveaux de NAD, à condition que l'engagement en aspartate par l'AO soit suffisant. Ainsi la QPT chez le tabac est fortement induite en cas de blessure et la production de nicotine en est dépendante (Wagner et al., 1986). De même, les activités NAD synthétase et NaMNAT sont fortement sollicitées lors de réactions de défense ou des besoins développementaux (Hayashi et al., 2005; Hashida et al., 2007; Hashida et al., 2009; Hashida et al., 2013). D'autres étapes enzymatiques peuvent encore jouer un rôle dans la production de NAD par les voies de recyclage comme la NaPT (Schipperers et al., 2008). On pourra aussi noter l'étroite corrélation entre les variations d'activité AO et les variations des niveaux de NAD, ce qui suggère que c'est bien la production d'AO qui gouverne les teneurs en NAD. Il est possible cependant que le niveau de production des autres enzymes de la voie soit coordonné à celui de l'AO afin d'assurer la production de NAD (Pétriaccq, 2011).

On constate chez les lignées transgéniques des niveaux d'ATP qui fluctuent en accord avec les variations de teneurs en NAD(H). Cela n'est pas surprenant puisque le NADH est utilisé pour la production d'ATP par phosphorylation oxydative (Friedkin & Lehninger, 1949). Dans le cas des plantes qui surproduisent l'AO, les teneurs en métabolites énergétiques sont augmentées. Ces plantes disposent de plus de ressources énergétiques pour croître et aussi d'un pool de ces métabolites plus élevé, qui pourrait leur permettre de faire face aux conditions adverses de l'environnement. Cet aspect sera discuté dans les chapitres ultérieurs.

Enfin on constate une légère oxydation du pool de glutathion chez les plantes mutantes *mAO*. La synthèse de glutathion à partir de la cystéine est réalisée par deux enzymes (γ -glutamyl cystéine synthétase ou γ -ECS, EC 6.3.2.2 et glutathion synthétase ou GSH-S, EC 6.3.2.3) (Mullineaux & Rausch, 2005). Non seulement ce

tripeptide est indispensable au maintien de l'état de réduction cellulaire, mais il sert également de cofacteur pour un certain nombre d'enzymes. Son état de réduction cytosolique est maintenu à un niveau élevé par la glutathion réductase (GR, EC 1.8.1.5) grâce au pouvoir réducteur du NADPH (Meyer et al., 2007). Une baisse des niveaux de nucléotides à pyridine, en particulier de NADPH, est donc susceptible d'affecter la réduction du GSSG.

D- L'altération du pool de nucléotides à pyridine affecte la croissance des plantes aux teneurs en AO dérégulées

La diminution des pools de NAD et d'ATP s'accompagne d'un ralentissement de la croissance des plantes. A l'inverse, lorsque les teneurs en NAD et en ATP augmentent, les plantes sont plus grosses. On peut donc imaginer qu'une variation des niveaux de nucléotides à pyridine affecte le métabolisme de telle manière qu'il s'ensuit une réduction ou une accélération de la croissance des plantes, et par corolaire un développement réduit ou accéléré d'organes comme les racines et les feuilles. En effet, chez d'autres organismes comme les bactéries et les levures, on constate que des teneurs élevées en nucléotides à pyridine s'accompagnent d'une plus forte production de biomasse (Liu et al., 2006; Zhu et al., 2008). Chez des mutants *nadk2* dans lesquels les niveaux de NADP(H) sont drastiquement diminués, cela s'accompagne d'une faible croissance et de moindres capacités photosynthétiques (Takahashi et al., 2009). Dans le cas des mutants *mAO*, il faudra vérifier que la diminution du pool de NADPH contrarie la photosynthèse. Cet aspect sera abordé dans le chapitre III. Les teneurs modifiées en NADH sont aussi susceptibles de perturber l'assimilation de l'azote, qui est l'un des principaux facteurs limitants de la croissance des plantes. En effet le NADH est utilisé par la nitrate réductase dans le cytosol, et une baisse en NADH pourrait affecter la réduction des nitrates, et par corolaire la croissance des plantes. La disponibilité en azote influence profondément la biomasse et la croissance des parties aériennes, notamment au cours d'une carence azotée (Scheible et al., 1997; Lemaire & Millard, 1999). Le chapitre IV adresse justement cette question.

L'ensemble des observations rapportées pour les mutants *mAO* aux niveaux de NAD diminués est à rapprocher de celles faites préalablement au laboratoire sur des lignées sous-produisant la QPT et affectées dans leurs niveaux de NAD et dont le comportement est similaire. Enfin, l'existence de plusieurs lignées mutantes *mAO*

présentant le même phénotype ainsi que la complémentation d'une des deux lignées qui redonne un phénotype sauvage aux plantes transformées par le gène endogène (**Figure 35**), démontrent que les observations réalisées sont bien dépendantes d'une altération de la biosynthèse de NAD. La même remarque peut être faite pour les lignées surproduisant l'AO et le NAD, des observations similaires étant faites sur plusieurs lignées 35S::AO indépendantes.

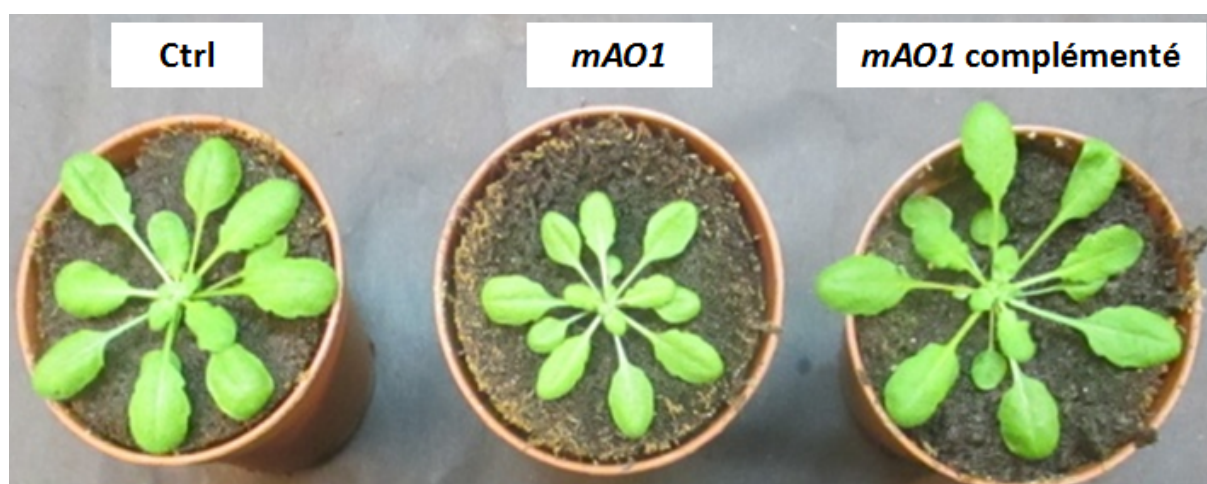


Figure 35. Photographie représentative des plantes. Plante contrôle (Ctrl), de la plante mutante homozygote d'insertion ADN-T pour la L-aspartate oxydase, (*mAO1*) et de la plante *mAO1* et d'une plante *mAO1* transformée avec le gène endogène (*mAO1* complémenté) cultivées sur terreau pendant 30 jours, en conditions de jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$.

Chapitre II

Impact des niveaux de NAD sur la croissance et le développement des plantes

Le développement d'une agriculture durable devra faire face dans les prochaines années à un défi majeur qui consiste à conserver une croissance de la production alimentaire au même rythme que celui de la population mondiale, alors qu'une baisse des surfaces de terres arables disponibles est constatée. Relever ce défi nécessitera de fournir des cultures à haute valeur nutritive, capables de mieux résister aux stress environnementaux, requérant moins d'intrants et poussant plus vite, pour au final délivrer de meilleurs rendements. En cela, l'optimisation du métabolisme énergétique pourrait permettre d'augmenter et les rendements actuels, et les rendements potentiels des cultures (**Figure 25**). La stratégie décrite dans ce manuscrit a justement pour objectif d'évaluer l'impact des modifications de l'homéostasie du NAD sur la croissance, le développement, le métabolisme et les réponses aux contraintes de l'environnement chez les plantes. L'obtention par une approche ciblée, de lignées aux niveaux de NAD constitutivement dérégulés, basée sur l'expression différentielle d'un gène unique de plante, nous a permis d'avoir en main les outils nécessaires à l'étude de ces phénomènes. Dans le chapitre présent, nous développeront une étude détaillée de la réponse des paramètres de productivité et de rendements liés aux teneurs en NAD chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

I- Les niveaux de NAD sont corrélés à la capacité germinative

Les graines sont des organismes anhydrobiotes qui constituent un modèle particulièrement résistant à des conditions environnementales extrêmes, permettant de décrypter le métabolisme dans un contexte de réhydratation et de redémarrage des activités métaboliques, dans lequel l'homéostasie du NAD joue potentiellement un rôle important (Hunt et al., 2004; Atkin & Macherel, 2009). Nous avons donc entrepris une étude de la vitesse de germination des graines issues des plantes aux teneurs altérées en nucléotides à pyridine. La vitesse de germination exprime le

temps moyen entre l'imbibition de la graine et l'émergence de la radicule de l'enveloppe de la graine.

Les graines des lignées *mAO* et *35S::AO*, sous-produisant et sur-produisant respectivement l'AO et le NAD, sont mises à germer sur milieu $\frac{1}{4}$ Hoagland's sans sucrose, contenant 5 mM ou 0,2 mM de NO_3^- comme source d'azote, pour milieu riche ou pauvre en azote respectivement. Chez les plantes mutantes *mAO*, le retard de croissance est noté dès la germination sur milieu riche en azote. Une perte de 10% de la capacité germinative est observée (**Figure 36**). Au contraire, la germination des graines des plantes surproduisant l'AO est accélérée sans altération de la capacité germinative sur milieu riche en azote (**Figure 36**).

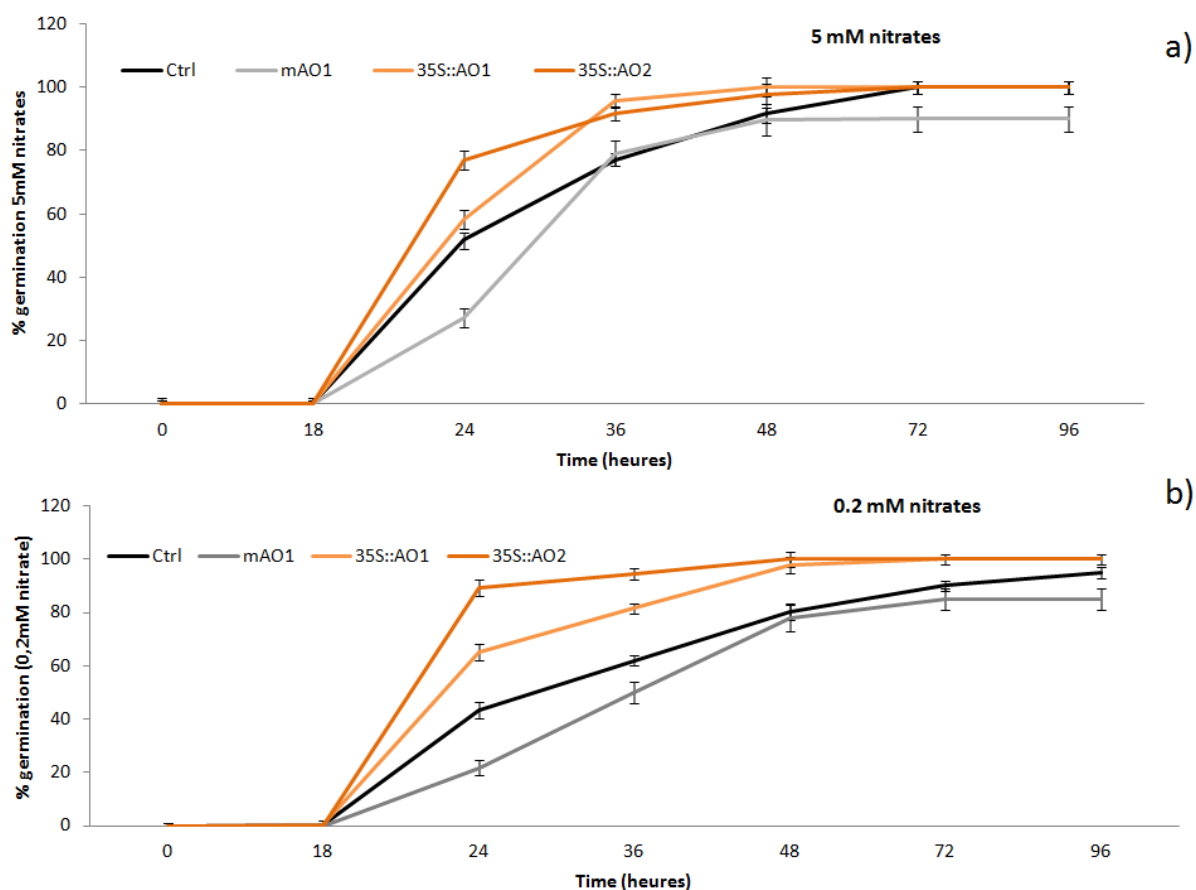


Figure 36 : Germination des semences d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1* et 2. a) sur milieu contenant 5 mM de nitrates. b) sur milieu carencé en nitrates (0,2 mM) cultivées *in vitro* en condition jours longs (photopériode 16h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{moles photons.m}^2.\text{s}^{-1}$. Cent graines par génotype ont été semées sur chacun des milieux. Les résultats représentent les moyennes de deux répétitions indépendantes \pm l'erreur standard.

La faculté germinative des plantes surexprimant l'AO n'est pas modifiée dans un environnement pauvre en azote comme cela est observé pour les semences témoins (**Figure 36**). Chez les graines de plantes mutantes *mAO*, la perte de capacité germinative reste la même, et on observe comme chez les graines contrôle, un ralentissement de la vitesse de germination sur milieu dépourvu d'azote (**Figure 36**). La surexpression de l'AO stimule ainsi la germination et les graines peuvent germer mieux dans des conditions de carence en azote. Inversement, moins d'AO et de NAD affecte la capacité germinative et la vitesse de germination des graines. Même si la vitesse de germination, en permettant l'implantation plus rapide/ plus lente de la plantule, participe à l'augmentation/ au ralentissement de la vitesse de croissance, la croissance différentielle entre les génotypes étudiés n'est probablement pas due uniquement à ce paramètre.

II- Les niveaux de NAD sont étroitement corrélés à la croissance des plantes et leur production de biomasse

Nous avons ensuite engagé une étude plus approfondie de la cinétique de croissance des lignées mutantes *mAO* et *35S::AO*, qui s'accompagne d'une mesure cinétique des niveaux de nucléotides à pyridine dans les plantes (**Figures 37 & 38**). Les résultats montrent que, dès deux semaines après semis, la différence de croissance des plantes surexprimant l'AO est déjà visible, et que cette différence de croissance se poursuit avec le temps (**Figure 37a**). Le maximum de différence est atteint après environ 6 semaines après semis. A ce stade, les lignées surexpresseurs ont un diamètre et une masse fraîche supérieure de 35% par rapport aux lignées Ctrl (**Figure 37 b et c**). Après ce stade, la différence de croissance perdure jusqu'à la transition florale, qui se fait précocement chez les lignées *35S::AO* par rapport au Ctrl (décalage d'environ une semaine ; **Figure 37a** et données non montrées). L'accélération de 12 heures de la germination chez ces lignées n'explique pas à elle seule l'avance de développement observée au moment de la transition florale (**Figure 37a**). Chez les mutants *mAO*, on observe un retard de croissance qui se traduit par un diamètre et une masse fraîche moyens inférieurs de 35% par rapport aux lignées Ctrl (**Figure 37 b et c**). Là encore le retard observé n'est pas à lui seul dû au retard de germination. En outre, l'une des lignées, *mAO1*, a un phénotype beaucoup plus prononcé que *mAO2*, les plantes restant plus petites pour un même stade de développement.

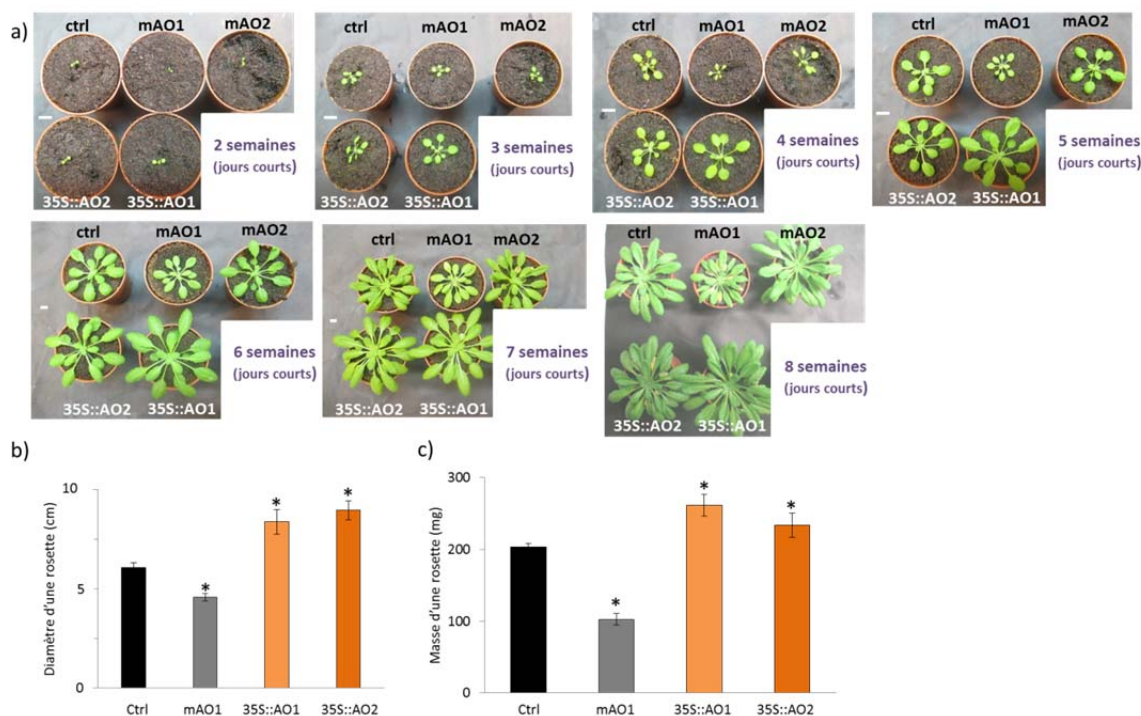


Figure 37. Analyse des différents paramètres de la croissance des différentes lignées Ctrl, mAO et 35S::AO en condition de culture jours courts. a) Photographies représentatives des plantes prise toutes les semaines entre 2 et 8 semaines. b) Diamètre (cm) et c) Poids (mg) moyen des rosettes âgées de 6 semaines. Les plantes ont été cultivées sur terreau en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de trois répétitions indépendantes \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

En parallèle à cette cinétique de croissance des plantes, les niveaux des pools de NAD ont été quantifiés dans l'ensemble des lignées (**Figure 38**). Les résultats montrent une forte corrélation entre les niveaux de NAD et les différences de développement des plantes (**Figures 37, 38 & 39**). Il est intéressant de noter que chez toutes les plantes, on observe une augmentation des niveaux de NAD^+ et de NADP^+ qui s'accompagne d'une augmentation parallèle de la croissance de toutes les lignées (**Figures 37 & 38**). Trente jours après semis, une stabilisation des pools de NAD^+ et NADP^+ , majoritaires parmi les nucléotides à pyridine, est observée. Les niveaux de ces deux nucléotides à pyridine ne redescendent qu'à partir de la mise à fleur (**Figure 38**). Les niveaux de NADH et NADPH, minoritaires parmi les nucléotides à pyridine, sont plus fluctuants, montant plus rapidement en début de croissance pour s'abaisser vers 30 jours et se stabiliser à la transition florale (**Figure 38**).

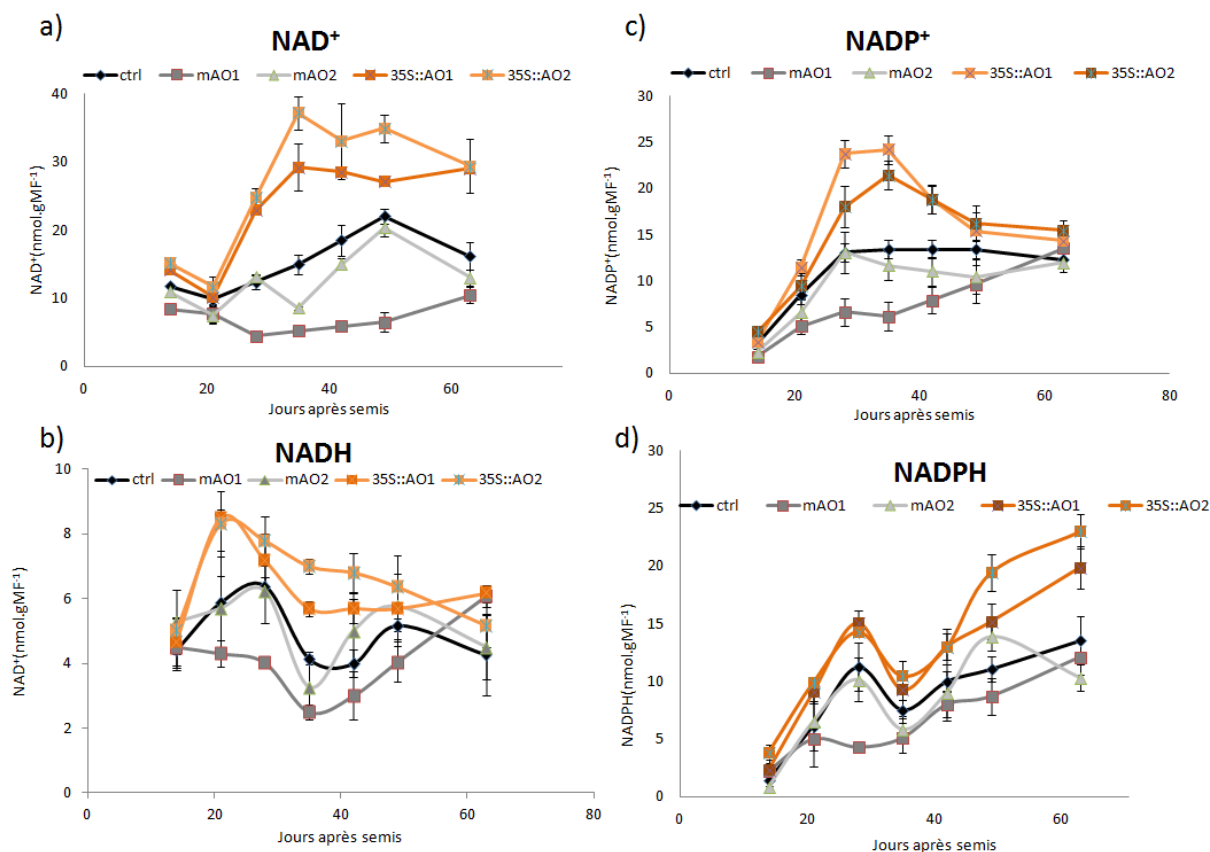


Figure 38 : Evolution des pools intracellulaires de nucléotides à pyridine libre au cours de la croissance des plantes transgéniques *mAO* et *35S::AO* de quinze à soixante jours après semis. a) NAD, b) NADH, c) NADP, d) NADPH. Les différentes lignées ont été mises à germer puis placées en chambre de culture jours courts (photopériode 8 h lumière). Les résultats sont exprimés en nmol de NAD+.g⁻¹ MF et correspondent à une seule expérience biologique réalisée au minimum trois échantillons par génotype. Les résultats représentent les moyennes de trois répétitions indépendantes \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

La comparaison des courbes de NAD⁺/NADP⁺ avec l'évolution de la croissance des plantes, nous montre qu'à 35 jours après semis le maximum de différences de croissance et de teneurs en NAD est atteint. De ce fait, sauf mention contraire, nous avons choisi ce stade pour la suite des analyses. A ce stade en effet, une corrélation très forte s'établit à la fois entre le diamètre de rosette des plantes et l'activité AO, et aussi entre le diamètre des rosettes et les niveaux de NAD mesurés (**Figure 39**). La taille des rosettes, qui reflète fidèlement la biomasse des plantes, est ainsi étroitement corrélée aux teneurs en NAD, montrant que ce métabolite rédox contribue à la production de biomasse des plantes (**Figure 39**).

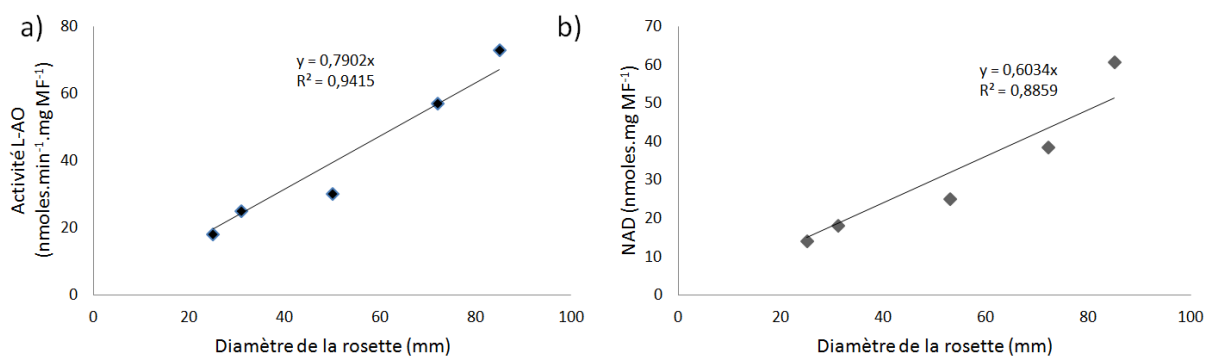


Figure 39 : Corrélation entre les pools de NAD, les activités AO et diamètre de la rosettes à six semaines après semis. a) corrélation entre activité AO et diamètre de la rosette. b) corrélation entre niveau de NAD et diamètre de la rosette. Les plantes ont été cultivées sur terreau en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. R^2 test de corrélation. $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$

III- Les plantes aux niveaux de NAD modifiés ont des paramètres de croissance similaires à ceux des plantes témoins

Les appareils aérien et racinaire fonctionnent de façon interdépendante, et ces deux systèmes maintiennent un équilibre de biomasse qui reflète l'abondance relative des ressources provenant de la fixation du carbone pour la partie aérienne et de l'absorption des éléments minéraux, principalement l'azote, pour la partie racinaire (Roycewicz & Malamy, 2012). En collaboration avec l'équipe d'Anne Krapp de l'INRA de Versailles, nous avons donc entrepris la mesure des ratios massiques appareil aérien / appareil racinaire pour l'ensemble des lignées étudiées. Ces ratio sont d'environ trois pour les plantes contrôle et les lignées surproduisant l'AO, alors qu'ils sont plus proches de quatre dans les lignées mutantes *mAO* pauvres en NAD (**Figure 40**). Sur milieu non carencé en azote, on associe souvent ce ratio à une « bonne santé » des plantes, et le déséquilibre de ce ratio et le retard de croissance observé dans les lignées mutantes *mAO*, reflèterait une altération de la balance C/N chez ces plantes (**Figure 40**). Cet aspect métabolique sera discuté dans le chapitre suivant.

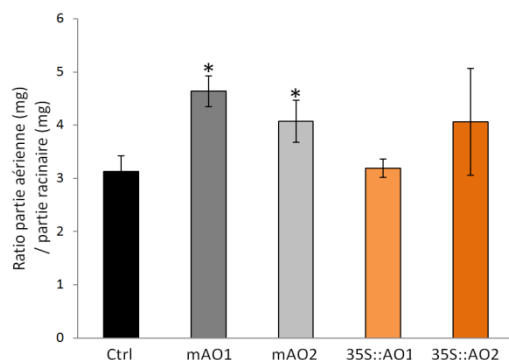


Figure 40 : Rapports entre masses fraîches des parties aériennes et racinaires sur des plantes de lignées Ctrl, mAO et 35S::AO d'*Arabidopsis thaliana* cultivées en milieu hydroponique en présence de 5 mM de nitrates. Les plantes ont été cultivées sur milieu hydroponique en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $120\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de dix plantes \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

Chez les végétaux supérieurs, l'évaluation de la masse fraîche n'est pas toujours une mesure adéquate. Bien que la plupart des plantes contiennent environ 90% d'eau, cette teneur est très variable, et la matière sèche peut fluctuer selon le statut hydrique de la plante. Nous avons donc entrepris la mesure des rapports surfaciques masse sèche / masse fraîche, permettant de détecter d'éventuelles altérations du contenu en eau des feuilles des différentes lignées étudiées. Ce ratio est stable dans l'ensemble des lignées, ce qui traduit un statut hydrique normal en conditions normales de culture (Figure 41).

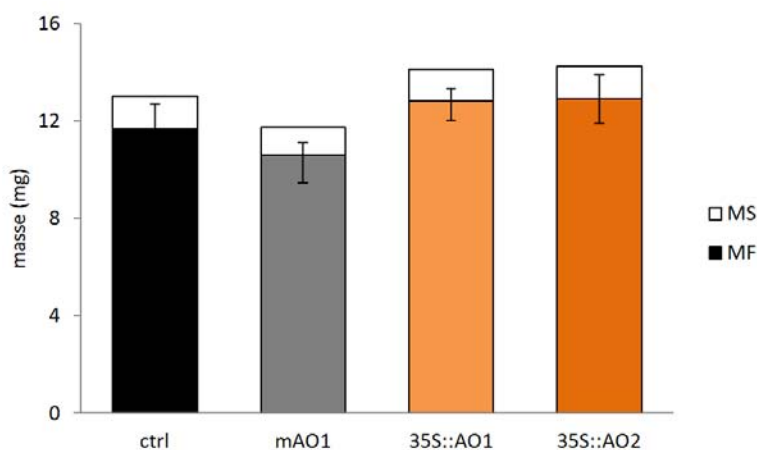


Figure 41 : Masse sèche (mg) et masse fraîche (mg) de trois disques foliaires de $0,8\text{ cm}^2$ de lignées Ctrl, mAO1 et 35S::AO1 et 2 d'*Arabidopsis thaliana*. Les disques foliaires sont issus de plantes cultivées sur terreau en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de trois répétitions indépendantes sur cinq échantillons par génotype \pm l'erreur standard.

La croissance des plantes se traduit par une augmentation irréversible de leur taille, qui provient de l'effet conjoint de la division cellulaire et de l'augmentation de la taille des cellules. Nous avons donc entrepris la mesure par microscopie photonique de la taille des cellules épidermiques, afin de déterminer si les altérations de croissance observées résultaient d'une multiplication cellulaire où de l'accroissement de la taille des cellules. La taille des cellules épidermiques des mutants *mAO* est 15% plus petite, alors que celle des lignées *35S::AO* est jusqu'à 35% plus grosse que celle des plantes Ctrl (**Figure 42**). Les niveaux de NAD produits dans les lignées influent donc sur la taille des cellules, du moins épidermiques, chez *Arabidopsis thaliana*.

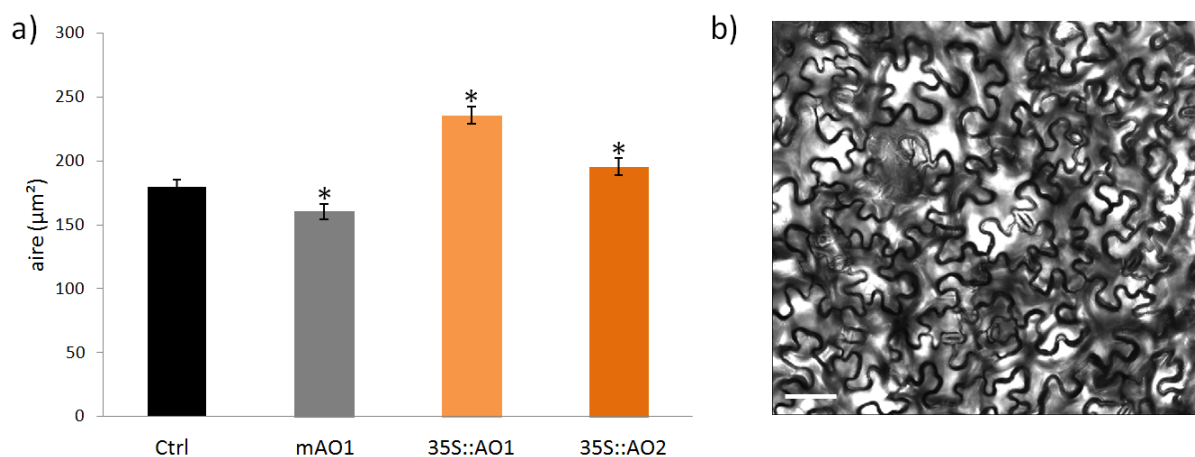


Figure 42 : Taille des cellules épidermiques (μm^2) de plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1* et 2. a) taille des cellules épidermiques, b) images représentatives de cellules épidermiques en microscopie confocale. L'échelle (barre blanche) : 200 μm . Les images ont été réalisées à partir de plantes cultivées sur terreau en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100 $\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de trois répétitions indépendantes sur trente échantillons par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

Les lignées aux niveaux d'AO modifiés présentent, comme nous l'avons vu ci-dessus, des tailles de cellules différentes. Or on sait qu'il existe une corrélation positive très marquée entre taille cellulaire moyenne et niveau de ploïdie moyen (Cheniclet et al., 2005). De ce fait, nous avons estimé par cytométrie de flux le niveau de ploïdie des cellules de feuilles (Brown et al., 1991). Il ressort de cette analyse que l'ensemble des lignées présentent un état diploïde (**Figure 43** et données non montrées). On ne peut donc pas expliquer l'augmentation ou la

diminution de la taille des cellules épidermiques observée par une altération du niveau de ploïdie des lignées.

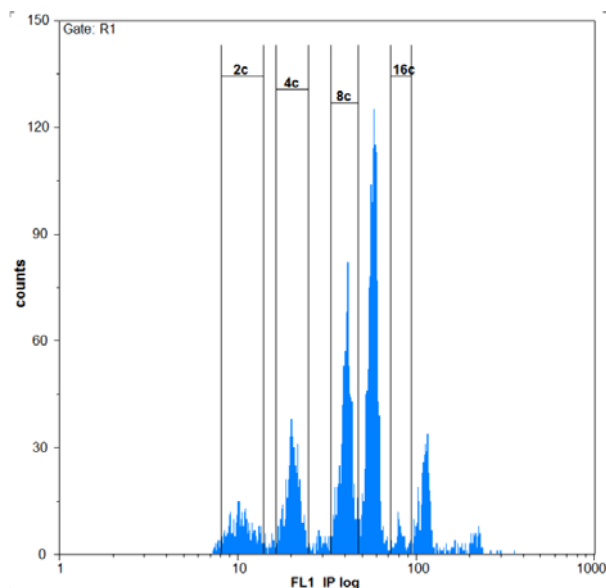


Figure 43 : Spectre représentatif obtenu par cytométrie de flux du contenu en ADN d'une plante 35S::AO d'*Arabidopsis thaliana*.

Comme nous venons de le voir plus haut, les plantes ont une croissance plus ou moins forte selon qu'elles ont un contenu plus ou moins élevé en NAD. Si la croissance et la production de biomasse sont des paramètres agricoles importants, notamment pour les cultures fourragères et les cultures destinées à produire des bio-fuels, c'est surtout le rendement en grains qui détermine la valeur économique d'une culture. Nous allons aborder cet aspect dans le paragraphe qui suit.

IV- Le rendement en grains est fonction des teneurs en nucléotides à pyridine dans les plantes

Le «rendement en grains» représente la quantité de grains, en poids ou en nombre, produite par la plante cultivée par unité de surface ou par plante, et ce pour une densité de plantation donnée le cas échéant. Le rendement en graines mesuré pour les plantes transgéniques surexprimant l'AO est supérieur de 45% à celle des plantes Ctrl (**Figure 44 a et b**). L'augmentation du rendement en grain est liée à l'augmentation du nombre de siliques, mais pas au nombre de grains par silique. Aussi, l'augmentation de la production de semences ne s'accompagne d'aucun problème de remplissage des siliques dans les plantes riches en NAD. Les plantes mutantes *mAO*, à faible activité AO, ont un rendement en graines de 42% inférieur

aux lignées Ctrl (**Figure 44c**). Ici encore, cela n'est pas dû à un problème de remplissage des siliques. Cette étude met en évidence que l'altération des niveaux d'AO et de NAD chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana* affecte plus le nombre de fleurs et de siliques produites par les plantes que leur remplissage. L'altération des niveaux d'aspartate oxydase et de NAD n'influe pas non plus sur le poids des graines, puisque toutes les lignées ont un poids de 1000 grains de 0,022 grammes. Il n'a pas non plus été constaté de différences significatives du nombre de fleurs non fécondées entre les lignées.

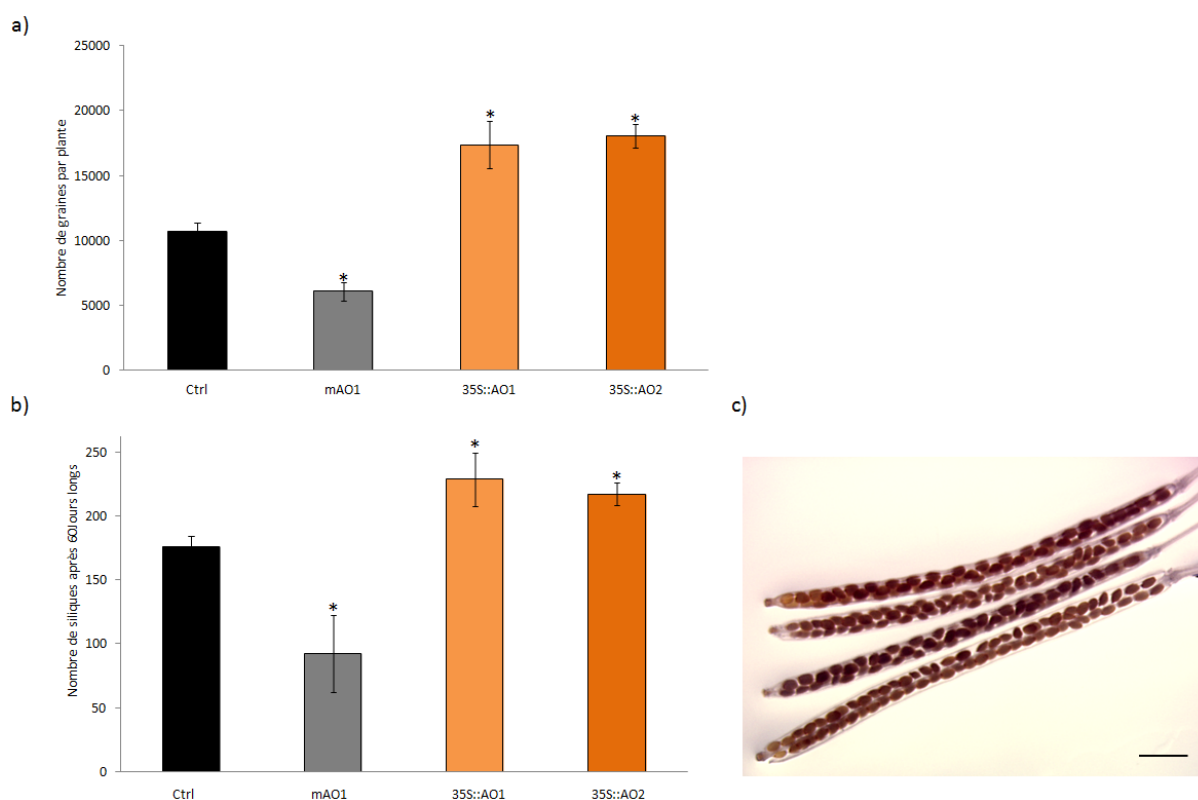


Figure 44 : Rendement en graines et nombre de siliques par plantes à maturité des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1* et 2. a) nombre de graines par plantes, b) nombre de siliques par plantes, c) image de siliques de plantes d'*Arabidopsis thaliana*. L'échelle (barre noire) : 0.4 cm Les plantes ont été cultivées sur terreau en condition jours longs (photopériode 16h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de trois répétitions indépendantes sur trente échantillons par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

V- Discussion

A- *Des plantes riches en énergie pour augmenter durablement les rendements*

L'importance du métabolisme énergétique dans la productivité des plantes est un concept plutôt bien accepté, puisque de nombreuses études ont corrélé les faibles taux respiratoires et les fortes capacités photosynthétiques à des rendements élevés. C'est surtout le ratio entre énergie consommée par la respiration et la teneur en métabolites énergétiques, encore appelé « Efficacité de l'Utilisation Énergétique » (EUE), qui semble déterminer les rendements, et cette augmentation des rendements est, au champ, souvent associée à la résistance aux conditions fluctuantes de l'environnement (De Block & Van Lijsebettens, 2011). La productivité des plantes est un trait agronomique complexe qui est déterminé par une combinaison de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux, qui interagissent bien souvent de façon non prédictible. A côté des facteurs qui contribuent directement à la productivité, il existe de nombreux facteurs secondaires comme les résistances aux stress, abiotiques notamment. En sélection variétale, différents types de rendements sont pris en compte, dont les plus importants sont (i) le rendement potentiel, (ii) le rendement atteignable et (iii) le rendement actuel (**Figure 25**). Le rendement potentiel est le rendement maximal qu'une culture peut atteindre en conditions optimales de croissance et de récolte. Il est déterminé par les constitutions génétiques et épigénétiques des cultures. L'objectif principal de la sélection variétale est d'améliorer ce rendement potentiel en introduisant de nouvelles ressources génétiques, tout en sachant que ce rendement est quasiment inatteignable, puisque soumis aux fluctuations environnementales. Ce qui est demandé aujourd'hui aux sélectionneurs pour répondre aux besoins d'une population mondiale croissante et aux exigences environnementales, est de fournir des variétés à hauts rendements, de qualités nutritionnelles élevées, nécessitant peu d'intrants et qui sont de surcroît peu sensibles aux stress environnementaux.

Afin d'augmenter les rendements et la biomasse disponible des plantes cultivées, des efforts ont été faits pour modifier le contenu de plantes en lignine, en régulateurs de croissance, ou en manipulant les voies liées à la photosynthèse. Des

travaux ayant conduit à dépôt de brevet décrivent ainsi une méthode qui consiste à surproduire une enzyme du métabolisme secondaire impliquée dans la synthèse de lignine pour produire plus de paroi et donc plus de biomasse et plus de graines (Tahir Abdul-Razzak & Werck, 2006 ; WO 2006100573 A1). Il existe aussi une méthode de traitement de semences par une molécule insecticide de la famille des isonicotinoïdes, à des fins d'augmentation de rendements (Asrar et al., 2003; WO 2003096811 A1). Cependant, l'utilisation de ces molécules, de structure proche des nucléotides à pyridine comme l'acide nicotinique et son précurseur le NAD⁺, est sujette à controverse en raison de leur impact sur la mortalité des abeilles. Les stratégies développées pour augmenter la production de biomasse ne se limitent pas non plus à des approches « gène unique » où « substance unique » (Bock, 2013). On peut citer par exemple les travaux qui visent à augmenter les capacités photosynthétiques des plantes en C₃ en contournant les voies photorespiratoires. Ainsi, une méthode qui consiste à obtenir des plantes transgéniques contenant la voie bactérienne d'utilisation du glycolate a été brevetée (Hain et al., 2006; US 20060095981 A1). Malheureusement, ces plantes produisent massivement des ROS qui stressent les plantes produites selon ce procédé (Kebeish et al., 2007; Maier et al., 2012). Jusqu'ici les méthodes permettant d'augmenter la production de biomasse visaient une voie métabolique particulière, permettant d'améliorer un trait génétique particulier, mais ne permettaient pas de traiter simultanément les problèmes de production de biomasse, de résistance au stress, de rapidité d'installation de la culture, auxquelles les plantes font face en plein champ. C'est pourquoi nous avons développé un procédé permettant d'influer sur l'ensemble des facteurs qui contribuent directement et de manière secondaire (les fluctuations de l'environnement) au rendement des cultures.

En surproduisant une molécule à la base du métabolisme énergétique, mais aussi impliquée dans la signalisation cellulaire dépendante des stress, nous avons obtenu des plantes qui présentent une croissance accélérée, une augmentation de biomasse, une augmentation du rendement, en particulier du rendement en grains. Ces augmentations de rendements sont fortement corrélées aux niveaux de surproduction de l'AO et de NAD. L'augmentation de la croissance des plantes, en particulier des racines, favorise la vigueur des plantes et leur capacité à récupérer les substrats nutritifs et l'eau dans le sol ou le milieu de culture. L'augmentation de la

vitesse de croissance des plantes, en particulier des inflorescences et des fruits, sont avantageuses pour la production de grains, de fourrage, de fleurs ou de fruits, en particulier de légumes-fruits pour les cultures potagères. Les graines des plantes surexprimant l'AO germent plus vite et de manière plus homogène que celles de plantes ne surexprimant pas l'AO. Cela peut permettre à la culture de plantes surexprimant l'AO de s'installer plus vite, limitant la concurrence d'espèces adventices et les pertes de rendements, ce qui est particulièrement important pour les espèces qui, comme le maïs, ne font pas de tallage. Pour cette raison aussi, des cultures de plantes surexprimant l'AO auraient des besoins moindres en traitements herbicides ciblant les adventices des cultures. Dans des conditions environnementales défavorables telles qu'un milieu carencé en azote, les graines de plantes surexprimant l'AO germent plus vite et surtout, maintiennent une capacité germinative maximale dans ces conditions, alors que la capacité germinative des plantes ne surexprimant pas l'AO est plus faible. Cela permet d'envisager une diminution de l'apport d'intrants azotés sur des cultures surexprimant l'AO. La surproduction de l'AO pourrait permettre aussi de s'affranchir d'un traitement de priming des graines, en particulier chez les espèces potagères, méthodologie financièrement coûteuse habituellement utilisée pour lever la dormance, accélérer et homogénéiser la germination des semences commerciales.

L'utilisation d'une cassette d'expression d'un gène unique sous le contrôle d'un promoteur constitutif n'est pas la seule approche qui permet d'augmenter la production de l'AO à des fins de surproduction de NAD. Sont ainsi envisagées des méthodes de sélection variétale assistée par marqueur moléculaire ou biochimique (par exemple en mesurant l'activité AO des variétés), la création de lignées d'introgession, ou encore l'utilisation de la technique du TILLING (de Bont & Gakière, 2014 ; Brevet Français N°06561-01).

B- Pourquoi les plantes poussent-elles mieux ?

Les données disponibles dans la littérature donnent de multiples raisons à une meilleure croissance des plantes. Nos résultats mettant en évidence une corrélation étroite entre modification des paramètres de croissance et des niveaux de NAD, nous nous attacherons ici, sur la base d'études déjà publiées, à donner quelques pistes qui pourraient avoir un lien avec le métabolisme du NAD.

1) L'augmentation de la croissance rencontrée parmi les lignées dérégulées dans la production de NAD est peut-être la conséquence d'une dérégulation de la production hormonale, le NAD(P)/H étant impliqué soit directement dans la biosynthèse de certaines hormones, soit dans la réponse aux hormones. C'est ainsi qu'une cytochrome P450 réductase, essentielle à la biosynthèse des gibbérellines (GA), utilise du NADPH. Sa sous-production entraîne une diminution drastique de la croissance des plantes (Malonek et al., 2004). A l'inverse, on sait que la surproduction de GA permet une augmentation de la biomasse des plantes (Eriksson et al., 2000; Biemelt et al., 2004). On sait aussi que le NADPH et le NADH sont impliqués dans la stéréochimie de certains brassinostéroïdes, ce qui laisse entrevoir une modulation possible de leur production par les nucléotides à pyridine (Stündl & Schneider, 2001). Or, les brassinostéroïdes, en modifiant l'orientation des feuilles, favorisent la photosynthèse et la production de biomasse par les plantes (Sakamoto et al., 2006; Divi and Krishna, 2009). Il a également été montré qu'une quinone réductase utilisant du NADH et du NADPH intervient dans la réponse primaire à l'auxine chez *Arabidopsis thaliana* (Laskowski et al., 2002), et que les gènes de réponse à l'auxine sont impliqués dans le contrôle de la taille des organes (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006). Les mutants *mAO* ont justement une taille réduite qui s'accompagne d'une forte diminution de la croissance racinaire. Il est donc possible que chez ces mutants à faibles teneurs en NAD, les niveaux d'auxines et/ou de gibbérellines soient modifiés.

2) L'augmentation de la croissance rencontrée parmi les lignées dérégulées dans la production de NAD est peut-être la conséquence d'une dérégulation épigénétique. Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, les enzymes impliquées dans le catabolisme du NAD interviennent aussi dans les

mécanismes de régulation épigénétique, et une altération des teneurs en NAD pourrait modifier la croissance des plantes par une régulation de l'expression des gènes et ou les niveaux d'activité d'enzymes du métabolisme primaire cibles de modifications à caractère épigénétique. A l'appui de cette hypothèse, des plantes de riz aux teneurs altérées en *OsSRT1* poussent plus lentement (Huang et al., 2007). Aussi, des plantes qui surexpriment une Nudix hydrolase dégradant le Coenzyme A ont une croissance et un rendement en grains plus important (Kupke et al., 2009). Il est dans ce cas intéressant de rappeler l'antagonisme qui existe entre l'acétyl-CoA et le NAD dans le contrôle de l'acétylation des protéines (Xing & Poirier, 2012). L'efficacité d'utilisation énergétique (EUE) semble aussi sous la dépendance de facteurs épigénétiques, puisque des plantes de même génotype ayant des différences d'EUE ont des profils d'expression de gènes du métabolisme respiratoire différents en raison de marques épigénétiques différentes (Hauben et al., 2009). Les auteurs de ces travaux ont développé une méthode de sélection assistée par PCR sur des gènes marqueurs d'un différentiel de croissance et de l'EUE afin de sélectionner des plantes ayant une meilleure vigueur et une meilleure tolérance aux stress abiotiques (De Block et al., 2012 ; WO 2012/041496). Les motifs de méthylation de l'ADN, qui interviennent dans l'expression des gènes et sont impliqués dans les phénomènes d'hétérosis en lien avec la production de biomasse, sont aussi sous contrôle d'éléments contrôleurs du rythme circadien comme CCA1 (CIRACADIAN CLOCK ASSOCIATED1) (Ng et al., 2014). Notons que chez les animaux, la NaMPT, enzyme de la voie de recyclage du NAD, participe au contrôle métabolique du rythme circadien en lien avec SIRT, et que la NaMNAT contrôle l'expression de PARP-1 en se fixant sur son promoteur (Imai, 2010; Imai and Guarente, 2014; Rehan et al., 2014). Cela montre qu'il existe une étroite coordination du métabolisme énergétique avec son contrôle circadien et épigénétique. Une telle situation est sans doute rencontrée chez les plantes. Un autre régulateur du rythme circadien, TIC (TIME FOR COFFEE), est ainsi impliqué dans la croissance et le développement des plantes. Les mutants *tic-2* montrent une croissance ralentie et des organes plus petits, des niveaux faibles de sucres libres et de fortes altérations métaboliques, ainsi qu'une résistance accrue au stress hydrique (Sanchez-Villarreal et al., 2013). Il semble donc probable qu'une perturbation des niveaux de NAD puisse moduler les régulations épigénétiques et circadiennes qui gouvernent l'expression des gènes impliqués dans la croissance des plantes.

3) L'augmentation de la croissance rencontrée parmi les lignées dérégulées dans la production de NAD est peut-être la conséquence d'une dérégulation de la respiration et de la photosynthèse. Une première évidence vient de l'étude de mutants mitochondriaux *CMS* et *NMS1* de tabac. Chez ces derniers on constate une accumulation de NADH associée à une forte induction des voies respiratoires alternes et une diminution de la photosynthèse, résultant en une diminution de la croissance (Sabar et al., 2000). Plus récemment, des mutants de déshydrogénases alternes qui montrent des teneurs en NAD(H) plus faibles et une sur-réduction du pool de NAD(H), ont une croissance ralentie (Wallström et al., 2014). Bien qu'il s'agisse d'exemples de perturbations respiratoires ayant un effet négatif sur la croissance, ces mutants illustrent bien l'importance d'une respiration optimale pour une meilleure croissance des plantes. La fixation du carbone par la Rubisco, indispensable à la production de biomasse par les plantes, est aussi l'objet de travaux visant à améliorer l'efficacité de son activité carboxylase (Raines, 2011). Les teneurs en chlorophylle des plantes sont pareillement déterminantes pour les capacités photosynthétiques des plantes (Janacek et al., 2009). Une augmentation des teneurs en NAD, qui stimule la synthèse de chlorophylle, est par conséquent susceptible de stimuler la fixation de carbone par les plantes (Chai et al., 2005).

A l'échelle de la plante, l'impact des niveaux de NAD sur la croissance de la plante résulterait plus d'une somme des effets qu'exercent les niveaux et l'état rédox des nucléotides à pyridine sur l'ensemble des voies métaboliques et de signalisation cellulaire. L'effet observé sur la croissance résulterait plus d'un « compromis » entre ces différentes fonctions altérés ou non par les niveaux de NAD, et centrales à la croissance et au développement des plantes (Sulpice et al., 2013; Kleessen et al., 2014). En nous basant sur les travaux de Pierre Pétriacq au laboratoire, lequel avait obtenu des mutants de la QPT aux faibles niveaux de NAD et altérés dans leur croissance (Pétriacq, 2011), nous avons décidé de poursuivre notre caractérisation des lignées dérégulées dans leur production de NAD par l'observation de paramètres physiologiques.

Chapitre III

Conséquences physiologiques des modifications des niveaux de NAD sur les échanges gazeux chez *Arabidopsis thaliana*

Afin d'identifier ce qui détermine la croissance différentielle des plantes en fonction de leurs niveaux en NAD, nous avons procédé à des tests physiologiques qui permettent de mesurer les échanges gazeux entre les feuilles et l'atmosphère environnante. Ces paramètres nous permettent surtout de savoir comment les teneurs en NAD modulent leur capacité à fixer du carbone nécessaire à leur croissance.

I- Les échanges de CO₂ et d'O₂ varient en fonction des niveaux de NAD

C'est en raison du rôle fondamental du NADP⁺ comme accepteur terminal de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons que nous nous sommes intéressés à l'impact d'une dérégulation de la biosynthèse du NAD sur les capacités photosynthétiques des plantes. Cette problématique a été investiguée chez les lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO* par des mesures d'échanges gazeux *via* un appareillage Li-Cor 6400 XT (Lincoln, USA), qui permet des mesures en temps réel. Les feuilles illuminées réalisent simultanément l'assimilation photosynthétique et la photorespiration, même si le premier processus est plus abondant, masquant presque complètement le signal respiratoire à la lumière. Le système utilisé mesure plusieurs paramètres. Les courbes A (Ci) correspondent à l'évolution de la photosynthèse nette (A) en fonction de la fraction molaire de CO₂ (**Figure 45a**). Les courbes A (PAR), où PAR signifie *Photosynthetically Active Radiation* (Radiation Photosynthétique Active), sont déterminées en faisant varier l'intensité lumineuse (**Figure 45b**). Les analyses d'évolution de la photosynthèse nette (A) en fonction de la fraction molaire de CO₂ montrent que jusqu'à 400 ppm (ppm = partie par million, soit 0,4% de l'atmosphère) la fixation nette de carbone est plus forte chez les lignées dérégulées pour la production de NAD, en particulier chez le mutant *mAO1* qui est celui qui présente la plus fort phénotype (**Figure 45b**). Au-delà de 400 ppm, la fixation du carbone est maintenue à un niveau élevé chez les lignées *35S::AO*, alors qu'elle s'effondre chez les mutants qui ont une plus faible production de NAD (**Figure**

45a). Les mesures de photosynthèse en réponse à la lumière indiquent que dès 50 μmoles de photons. $\text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ et au-delà, les lignées riches en NAD ont une activité photosynthétique plus grande que celle des plantes Ctrl, et que les lignées mutantes *mAO* ont à toutes les intensités lumineuse une activité photosynthétique inférieure à celle des plantes Ctrl (**Figure 45b**).

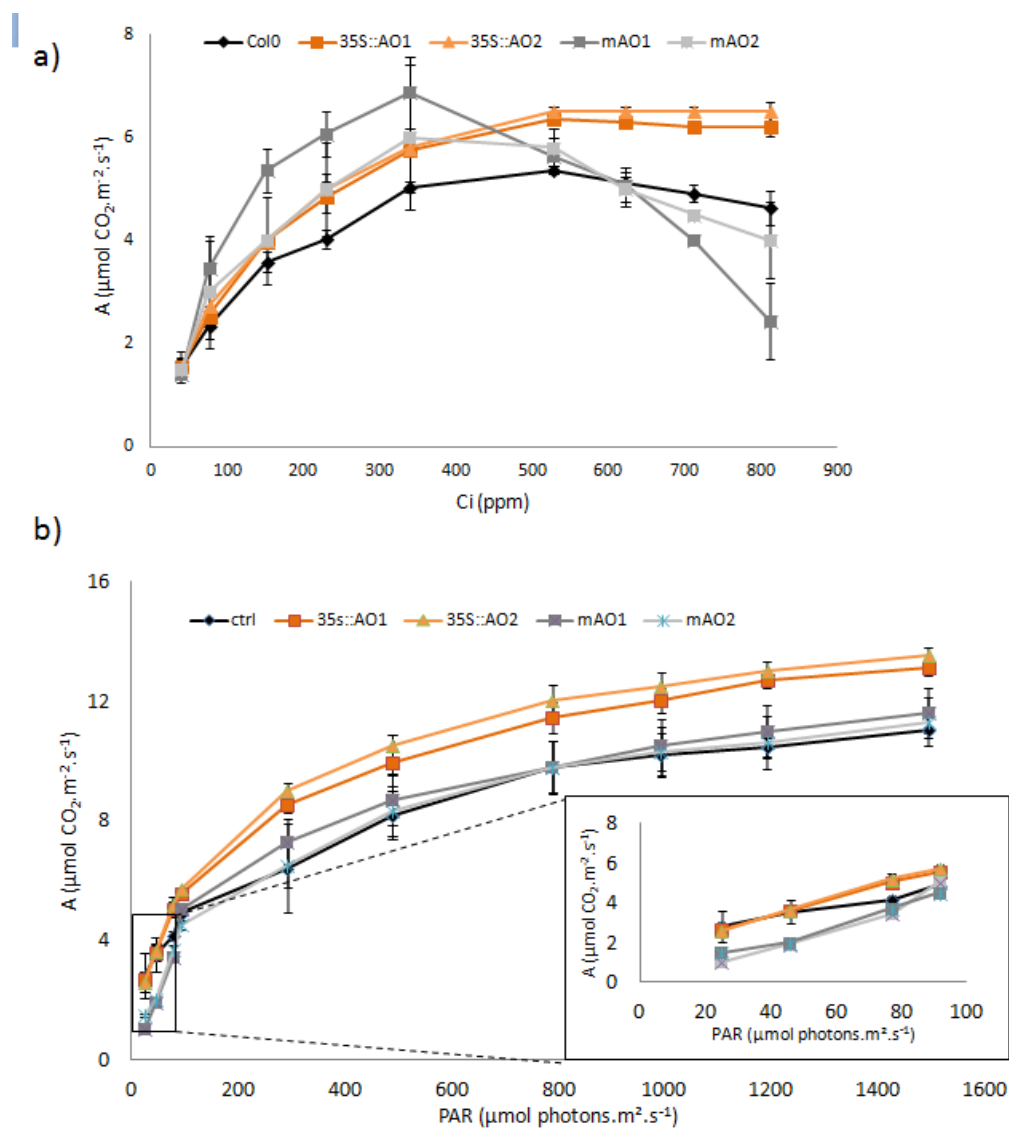


Figure 45 : Mesure des échanges gazeux des plantes des lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO*. Les échanges gazeux ont été analysés via un appareillage Li-Cor. a) courbe A(C_i) représentant la photosynthèse nette (A) en fonction de la fraction molaire en CO_2 . b) courbe A(PAR) correspondant à la photosynthèse nette en fonction de l'intensité lumineuse (PAR pour « photosynthetically active radiation »). Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 8 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de cinq plantes indépendantes par génotype \pm l'erreur standard.

Ainsi, pour une teneur en CO₂ atmosphérique normale (400 ppm), à l'intensité lumineuse à laquelle sont cultivées les plantes au laboratoire (100 $\mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), l'assimilation photosynthétique nette est nettement supérieure chez les plantes 35S::AO riches en NAD, alors qu'à l'inverse les plantes mutantes *mAO* pauvres en NAD ont une assimilation photosynthétique nette réduite.

Le système d'échange gazeux permet aussi de mesurer la respiration à l'obscurité, après arrêt de l'éclairage et stabilisation (**Figure 46**). Les valeurs de respiration mesurées sont deux fois plus faibles chez le mutant que chez les plantes Ctrl (de l'ordre de - 0.3 $\mu\text{moles d'O}_2.\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ contre - 0.6 $\mu\text{moles d'O}_2.\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour les plantes Ctrl), alors que l'activité respiratoire est de 50% plus élevée chez les plantes riches en NAD surproduisant l'AO (**Figure 46**). Cette étude montre que le NAD produit par les plantes stimule l'activité respiratoire à l'obscurité.

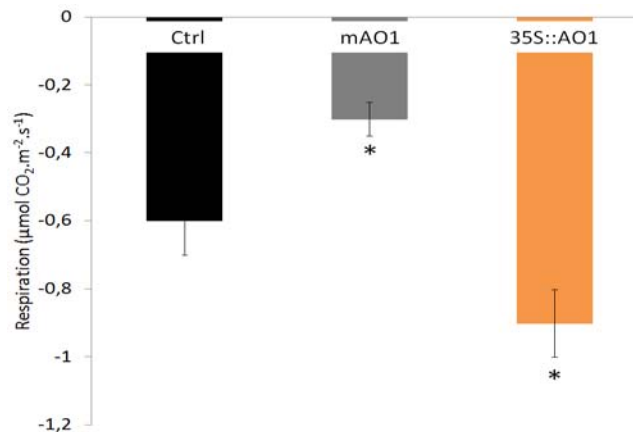


Figure 46 : Mesure de la respiration à l'obscurité obtenue en fin de mesure après arrêt de l'éclairage et stabilisation des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1*. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 8 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100 $\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de cinq plantes indépendantes par génotype \pm l'erreur standard, Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

Dans les conditions normales de culture on constate une stimulation des échanges gazeux sous forme d'O₂ et de CO₂ dans les plantes qui sont plus riches en NAD. Qu'en est-il dès lors des échanges de vapeur d'eau au niveau des feuilles ?

II- Les échanges d'eau des plantes sont altérés par les niveaux de NAD

En plus de nous permettre de mesurer les échanges d'O₂ et de CO₂, la technologie Li-cor® nous permet de mesurer les échanges d'eau entre la feuille et l'atmosphère. Dans un premier temps, nous avons mesuré la conductance stomatique (g_s , mesurée en mole d'eau.m².s⁻¹), qui correspond au taux de passage de CO₂ entrant, ou de pression de vapeur sortant, des stomates d'une feuille. Elle rend compte du degré d'ouverture de l'ostiole, et notamment l'entrée de CO₂ dans les cellules du mésophylle, où il sera assimilé sous forme de glucides. Le degré d'ouverture des stomates module donc la concentration interne en CO₂ et les pertes en eau de la plante par transpiration. A la lecture des résultats de la conductance stomatique, on constate qu'elle est deux fois plus forte chez les plantes 35S::AO riches en NAD que chez les plantes Ctrl, et est 30% plus forte chez les lignées mutantes *mAO* appauvries en NAD (**Figure 47**).

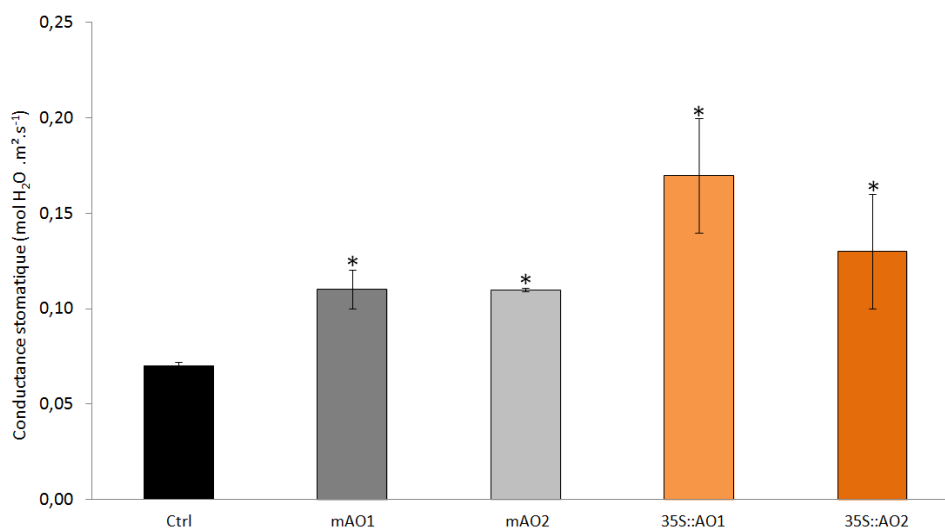


Figure 47 : Mesure de la conductance stomatique des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et 35S::AO. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 8 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100μmoles photons m².s⁻¹. Les résultats représentent les moyennes de cinq plantes indépendantes par génotype ± l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

La conductance stomatique (gs) ne peut refléter que les pertes en eau dues à la transpiration stomatique, alors que le taux de transpiration (E) estime les pertes en eau totales dues aux transpirations stomatiques et cuticulaires. La conductance stomatique (gs) et ses variations en fonction des conditions environnementales sont en partie génétiquement fixées et donc régulées par la plante lorsque le déficit de pression de vapeur (VPD), qui caractérise l'atmosphère, n'est ni trop faible ni trop élevé pour l'espèce concernée.

Le taux de transpiration (E) approche cette même composante et y ajoute la transpiration cuticulaire qui, en supposant que la cuticule foliaire soit stable d'une plante à l'autre, apparaît alors davantage soumise aux paramètres environnementaux, dans la mesure où elle ne peut pas être aussi directement régulée (Ehdaie et al., 1991). Dans une atmosphère caractérisée par un déficit de pression de vapeur (VPD) moyen, la perte d'eau par voie stomatique est largement majoritaire (environ 90 %) sur la perte en eau cuticulaire (environ 10 %) (Hopkins, 2003). A la lecture des résultats des taux de transpiration foliaire (exprimé en millimoles d'eau.m⁻².s⁻¹), on constate qu'il est 2,5 fois plus fort chez les plantes 35S::AO riches en NAD que chez les plantes Ctrl, et est 30% plus faible chez les lignées mutantes *mAO* appauvries en NAD (**Figure 48**).

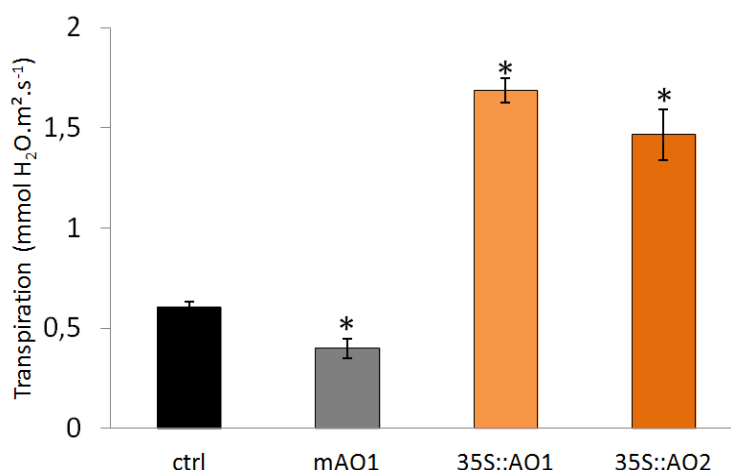


Figure 48 : Mesure de la transpiration foliaire des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1* et 2. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 8 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100μmoles photons m².s⁻¹. Les résultats représentent les moyennes de cinq plantes indépendantes par génotype ± l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les *Ctrl* et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

Il existe deux façons d'appréhender l'efficacité ou efficacité d'utilisation de l'eau (WUE pour « water use efficiency ») au niveau de la feuille : (i) Medrano et al., (2002) calculent le rapport entre assimilation nette de CO₂ et conductance stomatique (AN/g_s) alors que (ii) Swarthout et al., (2009) calculent le rapport entre assimilation nette de CO₂ et le taux de transpiration (A/E). Le calcul du rapport A/g_s nous a permis de mettre en évidence une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau de *mAO1*, mutant le plus appauvri en NAD, alors que les lignées *35S::AO* ont une efficacité d'utilisation moins bonne que celle des plantes sauvages (**Figure 49**). On peut donc affirmer que pour une molécule de CO₂ fixée, les plantes riches en NAD consomment plus d'eau que des plantes Ctrl.

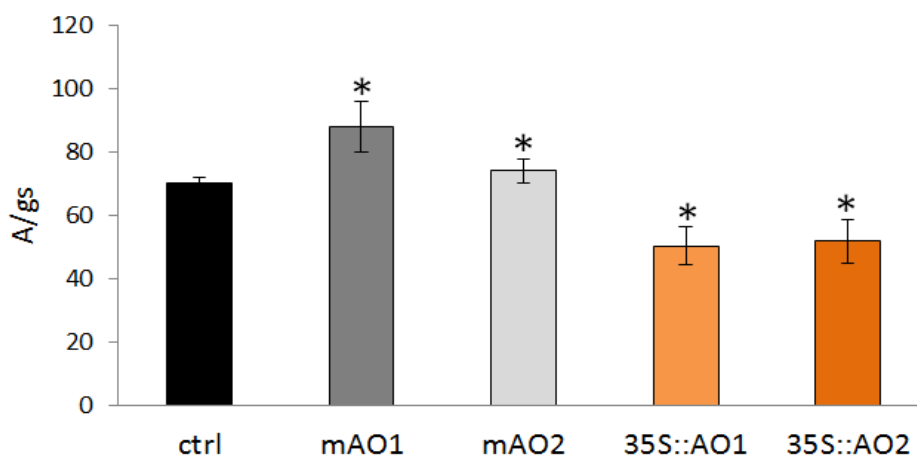


Figure 49 : Calcul de l'efficacité d'utilisation de l'eau des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO*. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 8 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100μmoles photons m².s⁻¹. Les résultats représentent les moyennes de cinq plantes indépendantes par génotype ± l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les *Ctrl* et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

Nous avons confirmé les résultats reposant sur des mesures d'échanges gazeux par la mesure en spectrométrie de masse isotopique EA-IRMS (pour « Elemental Analysis - Isotope Ratio Mass Spectrometry ») de l'enrichissement des plantes en deutérium (D), isotope stable de l'hydrogène. Cette technique détermine les teneurs en hydrogène des plantes et permet de calculer leur quantité de deutérium. A la lecture des résultats, on constate que toutes les lignées ont environ 4.5% d'hydrogène, ce qui reflète un statut hydrique équivalent dans nos conditions de

culture (**Figure 50a**). Les teneurs en deutérium (^2H) sont quant à elles similaires dans les plantes Ctrl et *mAO* avec une valeur calculée de -106‰ (**Figure 50b**). Le standard international pour la détermination du deutérium correspond au VSMOW (pour Vienna Standard Mean Ocean Water). Lorsqu'un échantillon est enrichi en ^2H par rapport au standard, son $\delta^2\text{H}$ sera positif. Lorsque l'échantillon est appauvri en ^2H par rapport au standard, le $\delta^2\text{H}$ est négatif. Le ^2H étant plus lourd que le ^1H , celui-ci va s'accumuler lors des phases de transpiration de la plante. Ainsi, plus une plante transpire, plus elle sera riche en deutérium. Les lignées *35S::AO* accumulent du deutérium ($+5\text{‰}$) par rapport aux Ctrl et *mAO* (**Figure 50b**).

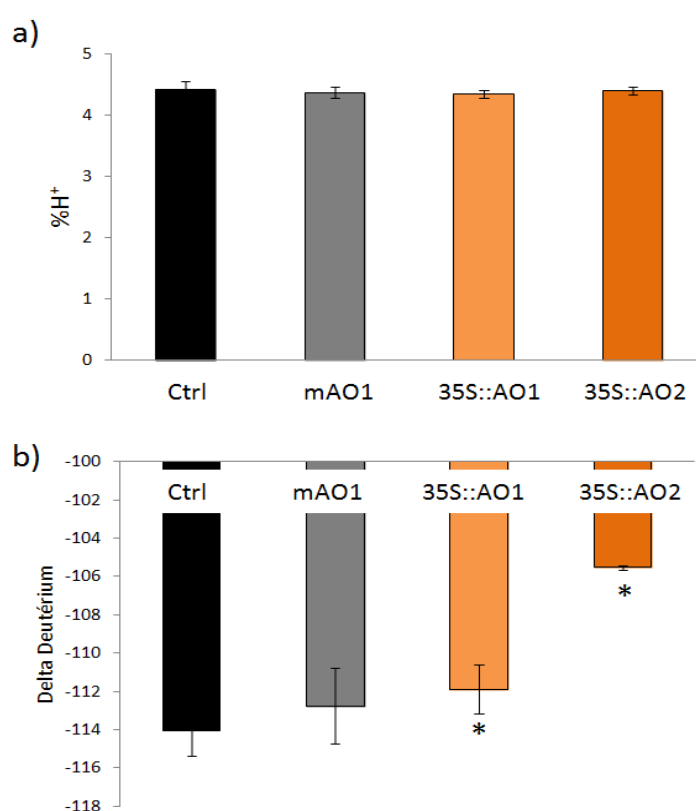


Figure 50 : Analyses foliaires du pourcentage d'hydrogène (a) et de l'abondance naturelle d ^2H (b) d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO* par EA-IRMS, Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{mol photons m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de cinq échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

Les résultats de cette section montrent que les plantes enrichies en NAD et qui ont une meilleure croissance et assimilation du carbone transpirent plus d'eau. Ces plantes échangent davantage avec l'atmosphère, et cela se traduit par une moins bonne efficacité d'utilisation de l'eau. A l'inverse, le mutant *mAO1*, dont la croissance et les teneurs en NAD sont les plus sévèrement touchés, a une meilleure utilisation de l'eau que les plantes contrôles.

III- Les teneurs en NAD influencent la taille des ostioles mais pas l'index stomatique

Ayant constaté des variations de taille des cellules épidermiques et des modifications des échanges gazeux, notamment de conductance stomatique, chez les plantes aux niveaux de NAD constitutivement altérés, nous avons entrepris un comptage des stomates à la surface des feuilles afin de déterminer leur index stomatique. L'index stomatique représente le ratio entre nombre de stomates et le nombre total de cellules sur l'épiderme (cellules épidermiques + cellules stomatiques). Ce ratio est constant dans l'ensemble des lignées (**Figure 51**). Les modifications des échanges gazeux précédemment décrites ne sont donc pas dues à ce paramètre.

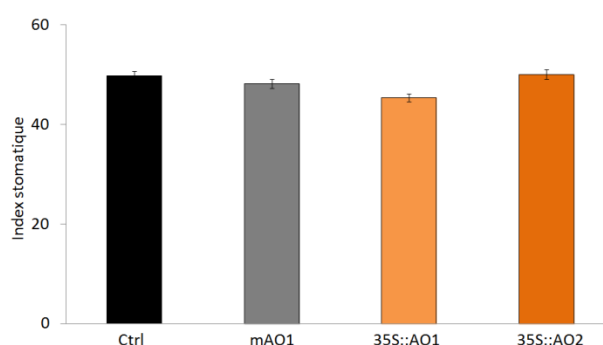


Figure 51 : Index stomatique calculé des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO*, L'index stomatique représente $100 \times \text{nombre de cellules stomatiques} / (\text{nombre de cellules stomatiques} + \text{nombre de cellules épidermiques})$. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de trois répétitions indépendantes sur trente échantillons par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

Puisque la taille des cellules épidermiques est modifiée chez les lignées étudiées, nous avons mesuré la taille des stomates par microscopie confocale. En effet, la taille des stomates est susceptible d'influer sur la taille des ostioles, donc sur les échanges gazeux. Les mesures effectuées montrent une légère augmentation de la taille des stomates, laquelle est significative pour les lignées riches en NAD (**Figure 52a**). De plus, ces mêmes lignées riches en NAD présentent des ostioles de plus grande taille (**Figure 52b**).

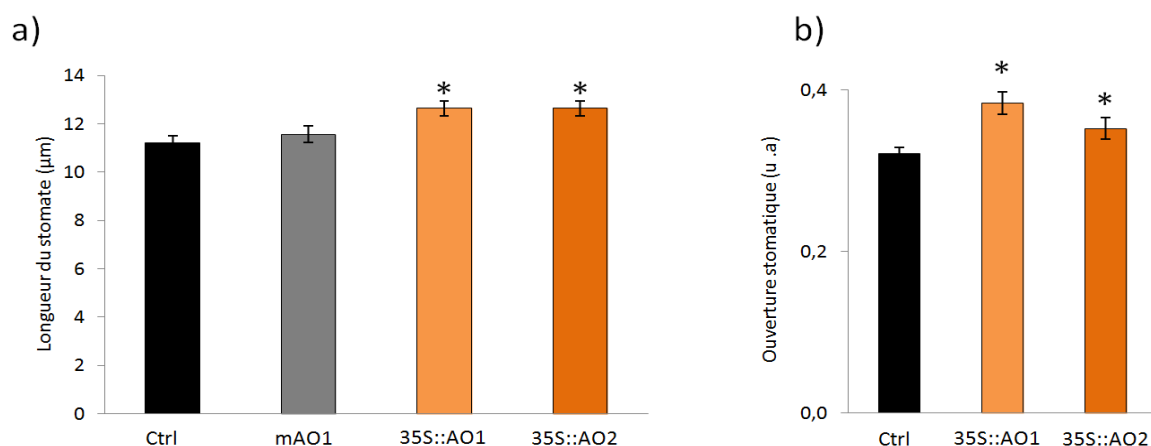


Figure 52 : Taille et ouverture des stomates des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO1 et 35S::AO. a) longueur des stomates (µm) b) ouverture stomatique (u.a), Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de trois répétitions indépendantes sur trente échantillons par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

Il est possible que l'augmentation des échanges gazeux mesurés chez les lignées riches en NAD soit la conséquence d'une augmentation de la taille des stomates.

IV- Discussion

La disponibilité en eau est l'une des contraintes majeures ayant des répercussions sur le rendement des cultures (Sinclair & Rufty, 2012) et constitue le facteur limitant le plus important à la production alimentaire mondiale, en raison principalement des pertes de productivité constatées pendant les périodes de sécheresse (Boyer, 1982; Mueller et al., 2012; Ittersum et al., 2013). Pour combattre l'impact désastreux des épisodes de sécheresse prévus en raison du dérèglement climatique, et ce dans un contexte d'augmentation des besoins croissants de la

population mondiale, la sélection de nouvelles variétés cultivées s'oriente vers des plantes ayant une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau (WUE pour « water use efficiency »), c'est-à-dire un meilleur rendement en carbone fixé par quantité d'eau consommée. La méthode traditionnelle utilisée par les agronomes permettant de déterminer la WUE se fait en rapportant le rendement ou la production de biomasse à la consommation d'eau estimée de la culture (Stanhill, 1986; Passioura, 2004; Bacon, 2009). Cette méthode est non seulement invasive mais surtout il faut attendre la récolte ainsi que des mesures de la consommation d'eau et des réserves encore disponibles au champ pour pouvoir faire cette estimation (Chaerle et al., 2005; Morison, 2008). D'autres méthodes plus rapides et moins invasives ont alors été développées.

La première repose sur la discrimination isotopique des atomes, ici du carbone (Farquhar et al., 1982; Condon et al., 2004), et a été utilisée avec succès pour identifier des variétés cultivées ayant une meilleure WUE. Cependant, cette technique ne permet pas de savoir si les différences de WUE sont dues à l'assimilation du CO₂ ou aux pertes en eau (Farquhar, 1998; Barbour, 2007), à moins de réaliser une mesure de la discrimination isotopique de l'oxygène qui pourrait permettre de distinguer le CO₂ assimilé des pertes en eau (Farquhar et al., 1989; Jones, 2004). Nous avons appliqué dans un premier temps la méthode de discrimination isotopique du carbone à nos échantillons et avons constaté que toutes les plantes aux niveaux de NAD modifiés avaient un $\delta^{13}\text{C}$ moins négatif que le Ctrl (données non montrées). Dans le cas des lignées 35S::AO, nous nous attendions à un $\delta^{13}\text{C}$ plus négatif en raison de leur transpiration excessive. Cela pourrait être en lien avec la respiration très importante de ces lignées. Par contre, nous avons aussi mesuré la discrimination isotopique de l'hydrogène, et avons pu déterminer par cette méthode que les plantes surproduisant le NAD étaient enrichies en deutérium et transpireraient donc davantage (**Figure 50**). La deuxième technique repose sur la mesure d'échanges gazeux en faisant le ratio assimilation nette du CO₂ (A) / taux de transpiration (E) (Meidner & Mansfield, 1968; Jones, 1998). Nous avons également appliqué cette technique et nos résultats montrent un meilleure WUE pour les mutants *mAO* qui échangent moins, et une plus faible WUE pour les plantes 35S::AO riches en NAD. Une troisième méthode, basée sur l'utilisation de la fluorescence de

la chlorophylle et de caméras thermiques, permet de sélectionner des plantes de manière non invasive selon leur WUE (McAusland et al., 2013).

En général, des valeurs élevées de WUE sont observées dans les plantes à faible conductance stomatique (g_s), mais cela est associé à une réduction de l'assimilation nette de carbone (A) et une réduction de la croissance de la plante. À l'inverse, les plantes à conductance stomatique élevée croissent plus vite en conditions de croissance optimale, mais ont un WUE plus faible (Lawson & Blatt, 2014). Pour les plantes d'intérêt agronomique et donc pour les sélectionneurs, il apparaît plus ou moins prioritaire, selon l'espèce cultivée, de privilégier la fixation du carbone sur la WUE, puisque l'augmentation des rendements photosynthétiques de 2 à 3% est suffisante pour augmenter substantiellement la croissance des plantes et la biomasse sur toute la période de végétation (Lefebvre et al., 2005; Zhu et al., 2007).

Parmi les lignées analysées dans cette étude, les mutants *mAO* appauvris en NAD ont une meilleure WUE mais une conductance stomatique plus grande (voir chapitre II), vraisemblablement due à une densité stomatique plus importante. Cette densité stomatique plus importante est parfois associée à une réduction de la taille des plantes, ce qui est le cas pour notre mutant (Doheny-Adams et al., 2012). Aussi, l'assimilation nette de CO_2 des mutants *mAO* aux concentrations atmosphériques actuelles en dioxyde de carbone n'est pas améliorée. Cela explique sans doute pourquoi ces plantes poussent moins bien.

Les lignées 35S::AO riches en NAD ont par contre un profil plus classique de plantes à faible WUE et forte conductance stomatique, associée à une fixation nette de carbone améliorée, et qui en font des plantes très performantes en conditions optimales de croissance. D'autres mutants à forte conductance stomatique, forte capacité photosynthétique, ayant souvent une forte croissance en conditions optimales, le tout associé à une faible WUE, ont déjà été décrits dans la littérature. C'est le cas des mutants *ssd1-1* (Schlüter et al., 2003) et *STOMATOGEN* (Tanaka et al., 2013). Généralement, l'augmentation de la conductance stomatique constatée chez ces plantes est soit associée à une plus forte densité stomatique (Masle et al., 2005; Beerling and Franks, 2009), soit à des stomates de plus grande taille (Lawson & Blatt, 2014), ce qui est le cas des lignées 35S::AO riches en NAD. Il est intéressant

de noter que chez des plantes d'*Arabidopsis thaliana* surproduisant le peptide signal EPF1, et qui ont de plus grosses stomates, on observe une transpiration réduite qui est associée à une meilleure croissance ainsi qu'une plus forte production de biomasse (Doheny-Adams et al., 2012). La densité des stomates est le fruit d'une longue évolution. Au cours de leur histoire évolutive, les plantes ont été exposées à de grandes variations de conditions environnementales qui ont dicté leurs adaptations génétiques à travers des mécanismes qui optimisent leur performance. Tout au long du Phanérozoïque, l'adaptation des plantes à des périodes géologiques aux teneurs en CO₂ atmosphérique différentes et qui se sont progressivement abaissées jusqu'à notre époque, a conduit à un passage de plantes à larges stomates peu nombreux et avec une faible conductance stomatique, vers des plantes à forte densité de stomates de plus petite taille et une forte conductance stomatique. Cette évolution au cours du dernier éon a ainsi conduit à une diminution de la WUE (Assouline & Or, 2013).

L'épaisseur de la feuille, ou plus exactement la densité massique foliaire, contribue aussi à une meilleure WUE, en augmentant les capacités photosynthétiques sans augmenter la transpiration. C'est probablement le cas des plantes surproduisant le peptide signal ERECTA aux feuilles épaissies (Masle et al., 2005). Un tel paramètre devrait être mesuré dans nos lignées.

Un élément supplémentaire permettrait d'expliquer l'intensité des échanges gazeux mesurés dans les plantes riches en NAD. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, ces plantes riches en NAD accumulent des acides organiques comme le malate, le fumarate et le citrate. Or ces acides organiques, lorsqu'ils s'accumulent, sont stockés dans les vacuoles des cellules. Dans les cellules de garde des stomates, cette accumulation régulerait l'ouverture des stomates, facilitant les échanges gazeux (Hedrich and Marten, 1993; Meyer et al., 2011).

Chapitre IV

Conséquences métaboliques des modifications des niveaux de NAD chez *Arabidopsis thaliana*

L'altération constitutive de la production de NAD chez *Arabidopsis thaliana* se traduit par une modification de la croissance qui s'accompagne d'une perturbation des échanges gazeux entre les feuilles et leur milieu, en particulier des changements notables des paramètres physiologiques du métabolisme carboné. L'objectif de ce chapitre est d'analyser quelles sont les conséquences métaboliques d'une manipulation de la biosynthèse de NAD chez des plantes présentant des niveaux de nucléotides à pyridines altérés de façon constitutive.

I- Les niveaux de NAD influent sur la machinerie photosynthétique et la fixation du CO₂ atmosphérique

La caractérisation des lignées *mAO* et *35S::AO* apporte deux outils dérégulés de façon opposée dans la production d'AO chez *Arabidopsis thaliana*, chez lesquels on mesure une fixation du carbone et une respiration fortement dérégulés. Nous avons entrepris de mesurer deux paramètres qui signent l'état de la machinerie photosynthétique, (i) la teneur en chlorophylle d'une part, dont on sait qu'elle peut être influencée par les niveaux de NAD (Chai et al., 2005), et (ii) l'activité carboxylase de la photosynthèse réalisée par la Rubisco d'autre part.

Les plantes mutantes *mAO* apparaissant de couleur verte plus pâle que les plantes Ctrl (**Figures 33 & 35**), nous avons entrepris un dosage des teneurs en chlorophylles totales par la méthode dite d'Arnon, adaptée de Bruinsma (Bruinsma, 1961). Les résultats révèlent une baisse d'environ un quart des teneurs en chlorophylle chez les plantes mutantes *mAO* par rapport au Ctrl ($8 \cdot 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{mg MF}^{-1}$ vs $6 \cdot 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{mg MF}^{-1}$) (**Figure 53a**), alors que la teneur en chlorophylles est sensiblement augmentée chez les plantes surproductrices de NAD (**Figure 53a**). Des mesures complémentaires en fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un SPAD-502 (KONIKA MINOLTA®), gentiment prêté par Dr. Frank Brentrup (YARA, Haninghof, Allemagne). Cette quantification non destructive permet de multiplier les répétitions à

condition que les plantes n'accumulent pas d'anthocyanes qui peuvent interférer avec les mesures. Les résultats obtenus suivent la même tendance que celle observée avec la méthode spectrophotométrique (**Figure 53b**). Les teneurs en NAD contribuent probablement à la synthèse et/ou à la stabilité des molécules de chlorophylle chez *Arabidopsis thaliana*.

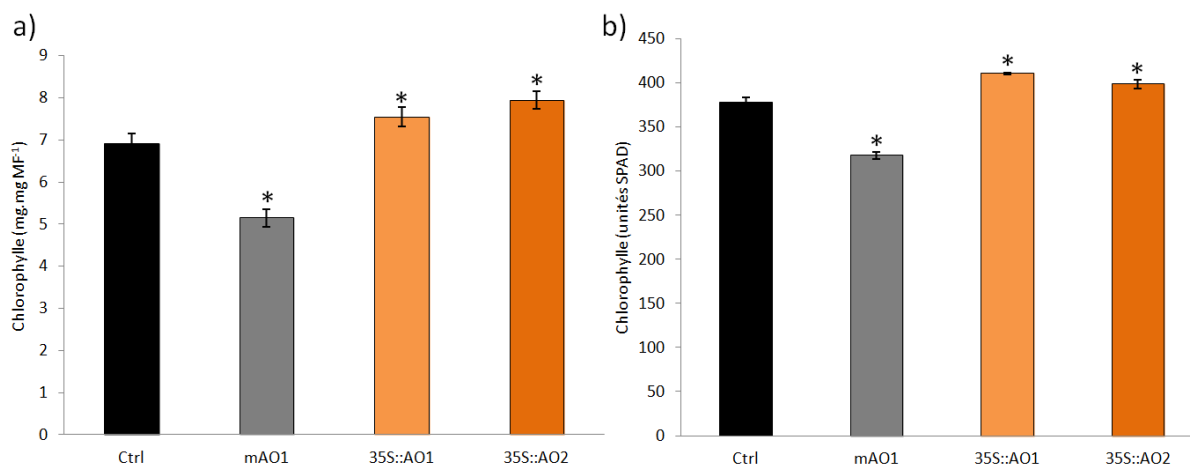


Figure 53 : Mesure des chlorophylles totales des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO et 35S::AO. a) par la méthode dite d'Arnon. b), mesure directe réalisée avec un « N-tester » basée sur la fluorescence de la chlorophylle. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de trois répétitions indépendantes sur 5 échantillons par génotype pour les mesures par méthode d'Arnon et de trois répétitions indépendantes sur trente échantillons par génotype pour les mesures directes \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

La RuBisCO est l'enzyme qui permet la fixation du CO_2 atmosphérique chez les plantes en C_3 . Nous avons entrepris la mesure de l'activité initiale de la RuBisCO par une technique de dosage au bicarbonate marqué au ^{14}C . La mesure des niveaux d'activité RuBisCO initiale extractible met en évidence une diminution de moitié de la capacité de fixation de CO_2 par la Rubisco chez les plantes mutantes mAO (8 $\mu\text{moles CO}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protéines totales vs 20 $\mu\text{moles CO}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protéines) aux teneurs en NAD diminuées (**Figure 54**). A l'inverse, l'activité Rubisco initiale augmente de 50% (30 $\mu\text{moles CO}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protéines) dans les lignées riches en NAD (**Figure 54**). Ces observations sont en accord avec les mesures de fixation du CO_2 réalisées à l'aide d'un Li-cor® décrites dans le chapitre précédent.

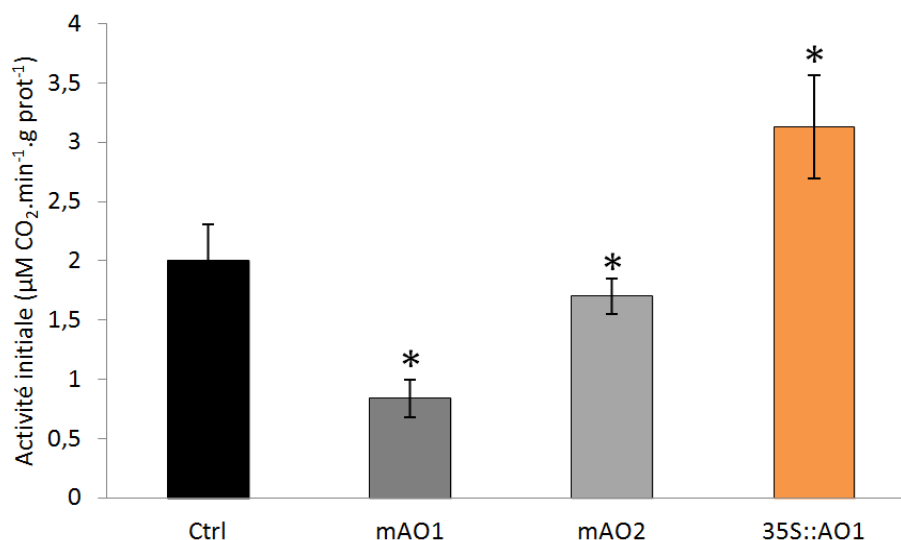


Figure 54 : Mesure des activités initiales de la RuBisCO chez des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et 2 et *35S::AO1*. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100 µmoles photons m².s⁻¹. Les résultats représentent les moyennes de trois échantillons par génotype ± l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

Ces expériences suggèrent que le NAD, en fournissant du pouvoir réducteur et en stimulant la synthèse de la machinerie photosynthétique, influe sur la fixation du carbone des plantes, et stimule ainsi la croissance des plantes.

II- Les niveaux de NAD influent sur la synthèse de molécules carbonées

Les paramètres photosynthétiques montrent des variations importantes suivant les niveaux de NAD des plantes. Afin d'avoir une idée du contenu réel des plantes en carbone, des analyses par EA-IRMS ont été conduites en collaboration avec la plateforme Métabolisme Métabolome de l'Institut de Biologie des Plantes. Les résultats montrent un contenu en carbone des plantes Ctrl de 35%. Les plantes mutantes *mAO* ont des contenus en C légèrement inférieurs (de 34% et 34.5%). Les lignées *35S::AO* contiennent de 35 à 35.5% de C (**Figure 55**).

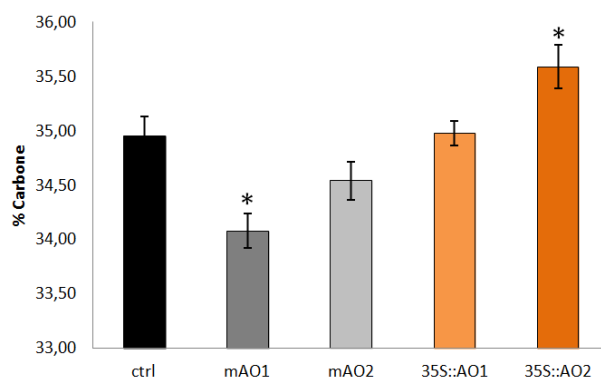


Figure 55. Analyses foliaires du pourcentage de carbone de la matière organique totale des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO* par EA-IRMS. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de cinq échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

A la lumière, une partie du carbone fixé par la photosynthèse est stocké sous forme d'amidon. La teneur en amidon foliaire a été estimée à partir de feuilles matures récoltées en fin de photopériode par une méthode enzymatique. Les résultats montrent une valeur de 30 mg.g MF^{-1} chez les plantes Ctrl. Chez les mutants *mAO* appauvris en NAD, cette valeur est diminuée d'environ 20%. Chez les lignées *35S::AO* riches en NAD, la quantité d'amidon est augmentée significativement d'environ 10% par rapport à celle des plantes Ctrl (**Figure 56**). Les niveaux de NAD influent donc sur la synthèse d'amidon au sein des feuilles.

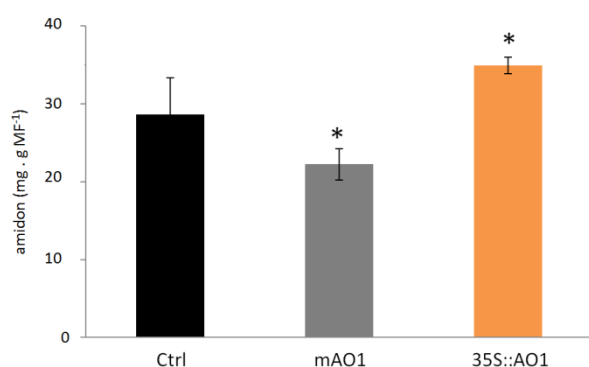


Figure 56 : Teneurs en amidon des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO*. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de cinq échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

Comme la plupart des plantes emmagasinent des glucides sous forme d'amidon, la dégradation de ce composé constitue le point de départ de la voie respiratoire du carbone. Afin d'entrer dans la glycolyse, le carbone des glucides de réserve comme l'amidon doit d'abord être hydrolysé sous forme de glucose ou de fructose. Ces deux hexoses ont été quantifiés par GC/MS dans nos lignées. Les résultats nous montrent une conservation des teneurs en glucose et fructose des lignées riches en NAD par rapport aux lignées Ctrl (**Figure 57**). Par contre, les teneurs en hexoses augmentent très fortement dans les lignées mutantes *mAO*. Chez ces lignées, la diminution des teneurs en NAD entraîne une accumulation des hexoses qui entrent dans la glycolyse et qui sont issus de la dégradation de l'amidon (**Figure 57**).

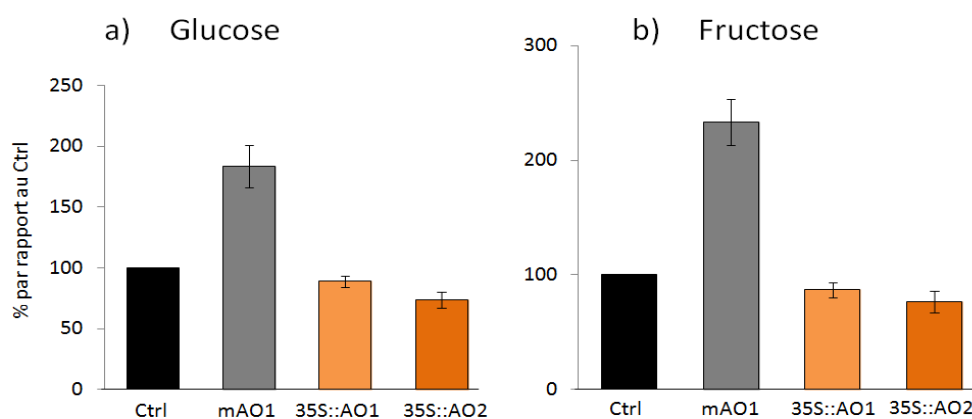


Figure 57 : Teneurs en a) glucose et b) fructose des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1* et *2* au stade 12 feuilles par GC-MS. Les plantes (stade 12 feuilles) ont été cultivées sur terreau en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en % par rapport au Ctrl et représentent les moyennes de quatre échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard.

La seconde étape de la respiration consiste en l'oxydation complète du pyruvate en eau et en CO_2 par le cycle de Krebs. Parmi les acides organiques intermédiaires de ce cycle, nous avons mesuré les teneurs en malate, fumarate et citrate, principaux intermédiaires du cycle. Les résultats nous montrent une conservation des teneurs en malate et fumarate des lignées appauvries en NAD par rapport aux lignées contrôle, mais avec une forte diminution du contenu en citrate. Par contre, les teneurs en acides organiques malate, citrate et surtout fumarate montent dans les lignées mutantes riches en NAD (**Figure 58**). Les teneurs en NAD semblent donc conditionner le niveau de principaux intermédiaires du cycle de Krebs.

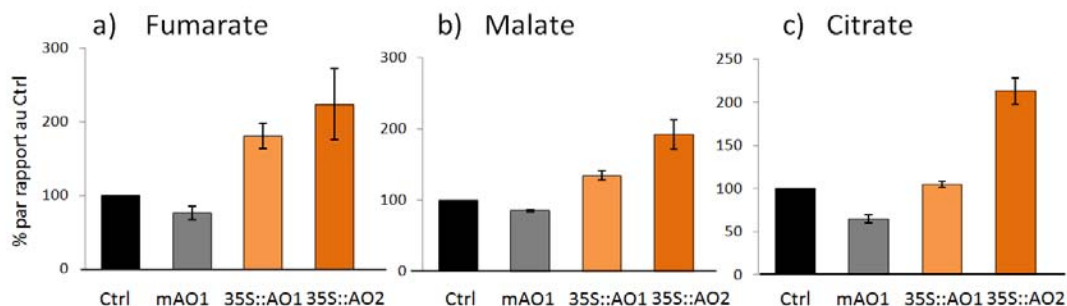


Figure 58 : Teneurs en intermédiaires du cycle de Krebs ; a) fumarate b) malate et c) citrate) des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1* et *2* au stade 12 feuilles par GC-MS. Les plantes ont été cultivées sur terreau en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en % par rapport au Ctrl représentent les moyennes de quatre échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard.

Le pyruvate est aussi le précurseur des acides organiques entrant dans une voie anaplérotique. En effet, le citrate du cycle de Krebs étant utilisé pour fournir les squelettes carbonés nécessaires à la synthèse d'acides aminés dans les plastes, il est essentiel que le cycle puisse être réalimenté en intermédiaires. Cette fonction est dévolue à la phosphoénolpyruvate carboxylase (ou PEPc, EC 4.1.1.31). Les mesures d'activité de la PEPc chez les lignées révèlent une augmentation de cette activité chez les plantes riches en NAD, (**Figure 59**). Les niveaux de NAD semblent donc moduler la production de PEP carboxylase et la voie anaplérotique.

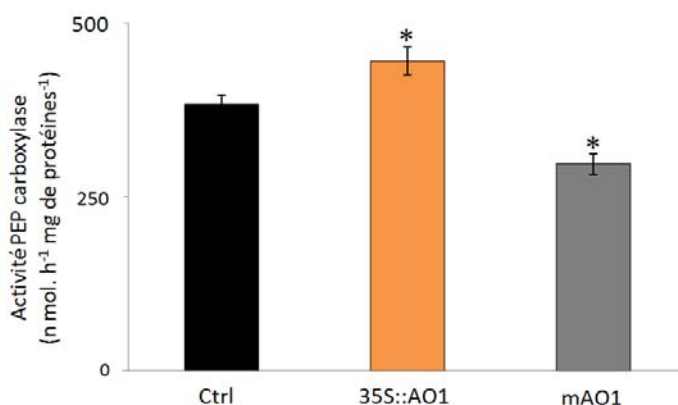


Figure 59: Mesure des activités PEPc dans les plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO*, Les plantes ont été cultivées sur terreau en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{moles photons m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, Les résultats représentent les moyennes de cinq échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

Ces expériences suggèrent que le NAD stimule la croissance des plantes en augmentant la photosynthèse et l'utilisation des assimilats pour la synthèse d'acides organiques nécessaires à la respiration et à la réalimentation du cycle de Krebs dont découle la synthèse des acides aminés.

III- Les niveaux de NAD influent sur la synthèse des acides aminés

Puisque nous disposons de systèmes altérés dans les niveaux de NAD(P)/H et que les activités PEPc sont modifiées dans nos lignées, une étude du métabolome a été réalisée afin de quantifier les acides aminés. Une technique de chromatographie liquide haute pression (HPLC) a permis de quantifier de nombreux amino-acides, à l'exception de certains présents en quantité infra-minoritaire chez *Arabidopsis thaliana*, comme l'histidine ou l'ornithine. Sur les 18 acides aminés quantifiés par technique de HPLC, 13 sont modulés dans leurs niveaux stationnaires (**Figure 60**). L'aspartate (Asp) et certains de ses dérivés, asparagine (Asn), lysine (Lys), thréonine (Thr) et Isoleucine (Ile), ont des niveaux plus faibles chez le *mAO* par rapport au Ctrl (**Figure 60**). Certains acides aminés dérivés du pyruvate, alanine (Ala) et valine (Val), ont leur niveau diminués chez *mAO*, où les teneurs en glycine (Gly) s'effondrent, alors que les teneurs en sérine (Ser) restent stables (**Figure 60**). Une variation du rapport Gly/Ser est souvent assimilée à une perturbation de la photorespiration. Le pool des autres acides aminés détectés en HPLC est comparable chez le mutant *mAO* et le Ctrl : g-ABA, glutamate (Glu), homosérine (hSer), phénylalanine (Phe). Les niveaux de glutamine (Gln) diminuent fortement chez le mutant *mAO*, diminuant le rapport Gln/Glu qui est un marqueur de l'assimilation de l'ammonium.

Les lignées surexpresser *35S::AO*, connaissent également une perturbation de la balance en amino-acides (**Figure 60**). Ainsi l'enrichissement en NAD entraîne une accumulation d'Asp, dans les lignées *35S::AO*. Cependant, les dérivés de l'Asp ont des niveaux diminués comme la Lys ou inchangés comme hSer, Thr ou Ile. L'Ala, dérivé du pyruvate, a une teneur plus forte chez les lignées *35S::AO*. Une légère augmentation de Trp, et une diminution de Phe, tous deux dérivés du shikimate, sont observées dans les lignées *35S::AO*. Pour ces lignées, le ratio Gly / Ser est inchangé de même que le rapport Gln / Glu.

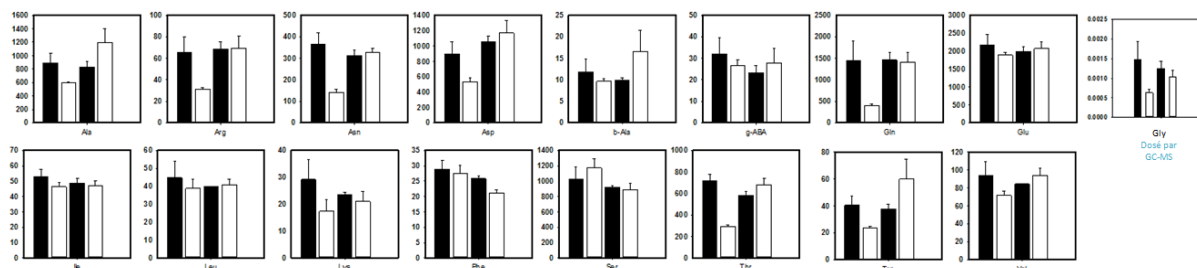


Figure 60 : Contenu en acides aminés des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1*, et *35S::AO1* et 2 au stade 12 feuilles par HPLC (à l'exception de la glycine mesurée par GC-MS). De gauche à droites les barres représentent successivement, pour chacun des acides aminés dosés, Ctrl, *mAO1*, *35S::AO1* et enfin *35S::AO2*. Les plantes ont été cultivées sur terreau en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de quatre échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard.

IV- Les niveaux de NAD modifient les contenus en azote chez les lignées étudiées

Les variations des teneurs en acides aminés et organiques suggèrent une forte altération du métabolisme azoté des plantes aux niveaux en NAD dérégulés. Afin d'avoir une idée du contenu réel des plantes en azote, des analyses par EA-IRMS ont été conduites. Le contenu en N, exprimé en % est proche des 6.7% pour les lignées Ctrl et 6,5% pour les lignées mutantes *mAO*, ce qui est conforme avec les données de la littérature (Krapp et al., 2011). Les lignées *35S::AO* accumulent 12% de N supplémentaire par rapport aux plantes Ctrl (**Figure 61a**). Les teneurs en NAD semblent donc corrélées aux teneurs en azote total dans les lignées de plantes que nous avons étudiées.

Le $\delta^{15}\text{N}$ des plantes a également été calculé. Le standard international utilisé dans ce cas est l'azote atmosphérique, dont la valeur $\delta^{15}\text{N}$ est par définition 0, et qui comporte une proportion de ^{15}N de 0.3663‰. Le $\delta^{15}\text{N}$ est de 6.2‰ pour les plantes Ctrl. Il est réduit de moitié chez les *mAO* (**Figure 61b**). Dans les plantes *35S::AO*, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sont également plus faibles et atteignent environ 4‰ (**Figure 61b**). La discrimination à l'égard du ^{15}N par la NR est un déterminant majeur de différences isotopiques entre les pools d'azote (Carlisle et al, 2014). Ainsi, le $\delta^{15}\text{N}$ pourrait traduire une augmentation d'activité NR et de l'assimilation de l'N dans les plantes aux niveaux de NAD modifiés.

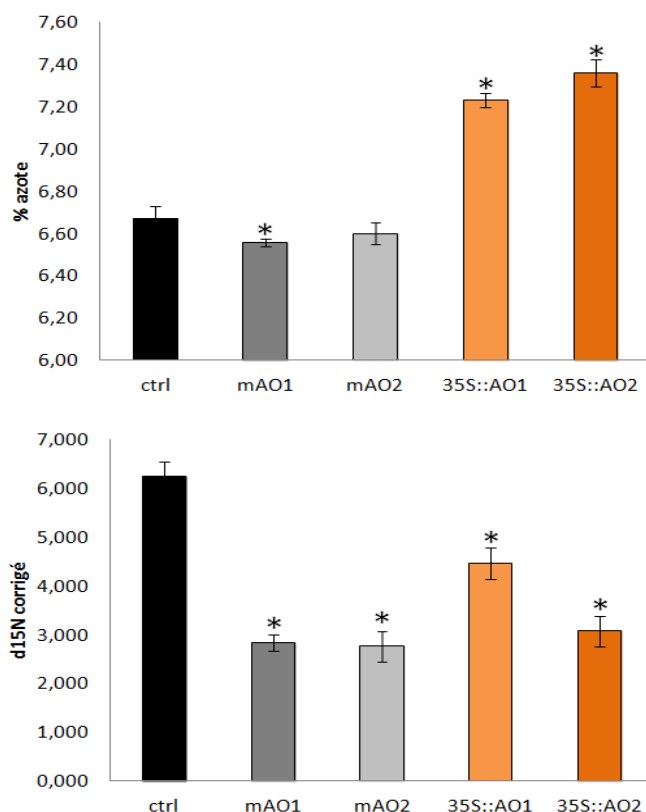


Figure 61. Analyses foliaires du pourcentage d'azote (a) et de l'abondance naturelle d'¹⁵N (b) d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO et 35S::AO par EA-IRMS, Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100μmoles photons m².s⁻¹. Les résultats représentent les moyennes de cinq échantillons indépendants par génotype ± l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

V- L'expression de l'AO influe sur l'assimilation de l'azote

L'assimilation de l'azote chez les plantes débute par une réduction des nitrates en nitrites, réaction catalysée par l'enzyme nitrate réductase (NR). Cette enzyme utilise le NAD(P)H comme cofacteur. Il peut alors apparaître pertinent de mesurer la capacité de cette enzyme qui occupe une place critique dans le métabolisme azoté. Les niveaux de transcrits des deux gènes codant les deux isoformes de la NR, *NIA1* et *NIA2*, ont été déterminés par qPCR. Chez le mutant *mAO*, les niveaux de transcrits *NIA1* et *NIA2* sont drastiquement diminués par rapport au Ctrl, notamment pour le gène *NIA2* dont l'expression est réprimée d'environ 88 %. A l'inverse, les niveaux de transcrits *NIA1* et *NIA2* sont fortement augmentés chez les plantes *35S::AO* surproduisant l'AO (**Figure 62**).

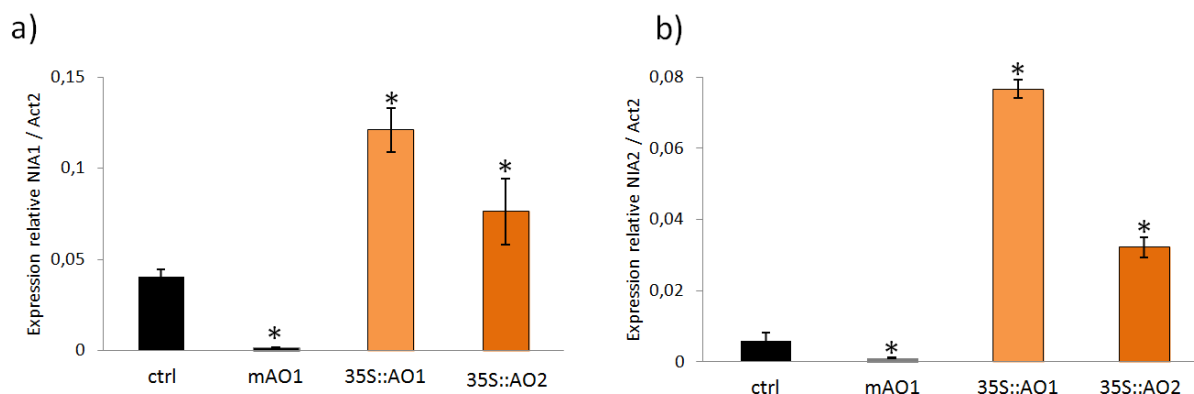


Figure 62, Analyses des niveaux de transcrits de la nitrate réductase des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO1 et 35S::AO1 et 2. a) Transcrits NIA1 b) transcrits NIA2, Expression relative par rapport au gène de référence Act2, Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de deux répétitions biologiques de trois échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

L'activité extractible *in vitro* de la NR a également été évaluée en présence de MgCl_2 (capacité endogène) pour les feuilles de plantes contrôle et 35S::AO. Chez les plantes surexprimant l'AO, l'activité NR mesurée dans les feuilles est également plus importante comparée au Ctrl, de l'ordre de 55% en plus (**Figure 63**). La production de NR est donc conditionnée par les teneurs en NAD chez *Arabidopsis thaliana*.

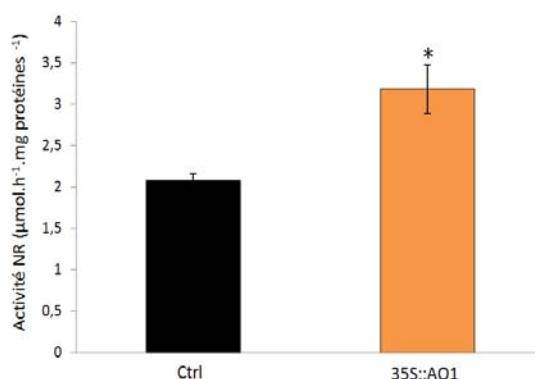


Figure 63, Mesure de l'activité Nitrate réductase endogène des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl et 35S::AO1, Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de deux répétitions biologiques de trois échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

Les fortes fluctuations des transcrits *NR* en réponse à la dérégulation de la production d'AO nous ont conduits à mesurer chez les plantes *mAO* et *35S::AO*, les teneurs en NO_3^- et NH_4^+ par spectrophotométrie. Chez les mutants *mAO*, les niveaux de nitrates et d'ammonium chutent drastiquement et sont respectivement divisés par sept et par deux (**Figure 64**). A l'opposé, les lignées *35S::AO* enrichies en NAD ont des niveaux de nitrates et ammonium augmentés (**Figure 64**).

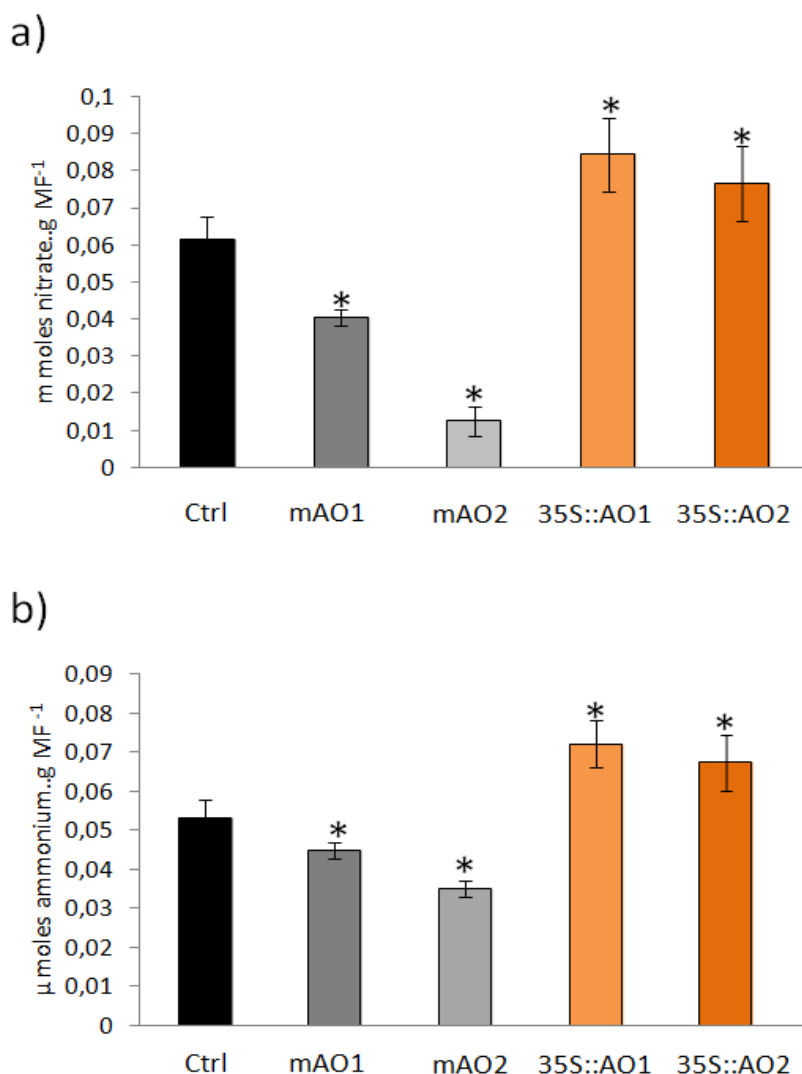


Figure 64 : Mesure des ions nitrates et ammonium des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO*, Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de trois répétitions biologiques de trois échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

Ces expériences mettent en évidence une forte influence des niveaux de NAD sur les premières étapes de l'assimilation primaire de l'azote dans les lignées étudiées. Des niveaux de NAD élevés stimulent l'assimilation primaire en augmentant les niveaux de nitrates et ceux de NR, alors qu'une baisse des niveaux de NAD abaisse les teneurs en nitrates et en transcrits NR. Les teneurs en ammonium mesurées ici suivent la même tendance.

VI- La richesse en NAD ne modifie cependant pas l'incorporation de nitrates par les plante

Une des questions est de savoir si les variations de teneurs en nitrates dans les feuilles résultent d'une modification de la vitesse de leur incorporation dans les racines. Pour répondre à cette question, nous avons effectué des mesures d'incorporation de nitrate marqué à l'azote 15 . A cette occasion, des cultures en hydroponie ont été réalisées à l'INRA de Versailles dans le cadre d'une collaboration avec Anne Krapp.

Des influx de 5 minutes dans un milieu contenant $0,2\text{mM}^{15}\text{NO}_3^-$ (pauvre en azote) ou dans un milieu contenant $5\text{mM}^{15}\text{NO}_3^-$ (riche en azote) ont été réalisés, afin d'obtenir les résultats de vitesse d'absorption du nitrate par les racines. Les résultats de la **figure 65** montrent que l'enrichissement en ^{15}N est 5 fois supérieur dans les plantes traitées avec la solution à $5\text{mM}^{15}\text{NO}_3^-$ par rapport aux plantes traitées avec $0,2\text{mM}^{15}\text{NO}_3^-$. Cependant, aucune différence significative de vitesse d'influx des nitrates dans les plantes n'est observée entre les différentes lignées. La dérégulation des niveaux de NAD dans les plantes ne modifie donc pas l'incorporation des nitrates sur un temps court lorsque les transporteurs à forte affinité sont induits par le passage sur milieu appauvri en azote. Cela traduit plutôt une réaction locale immédiate indépendante des signaux provenant des teneurs en NAD dans les plantes.

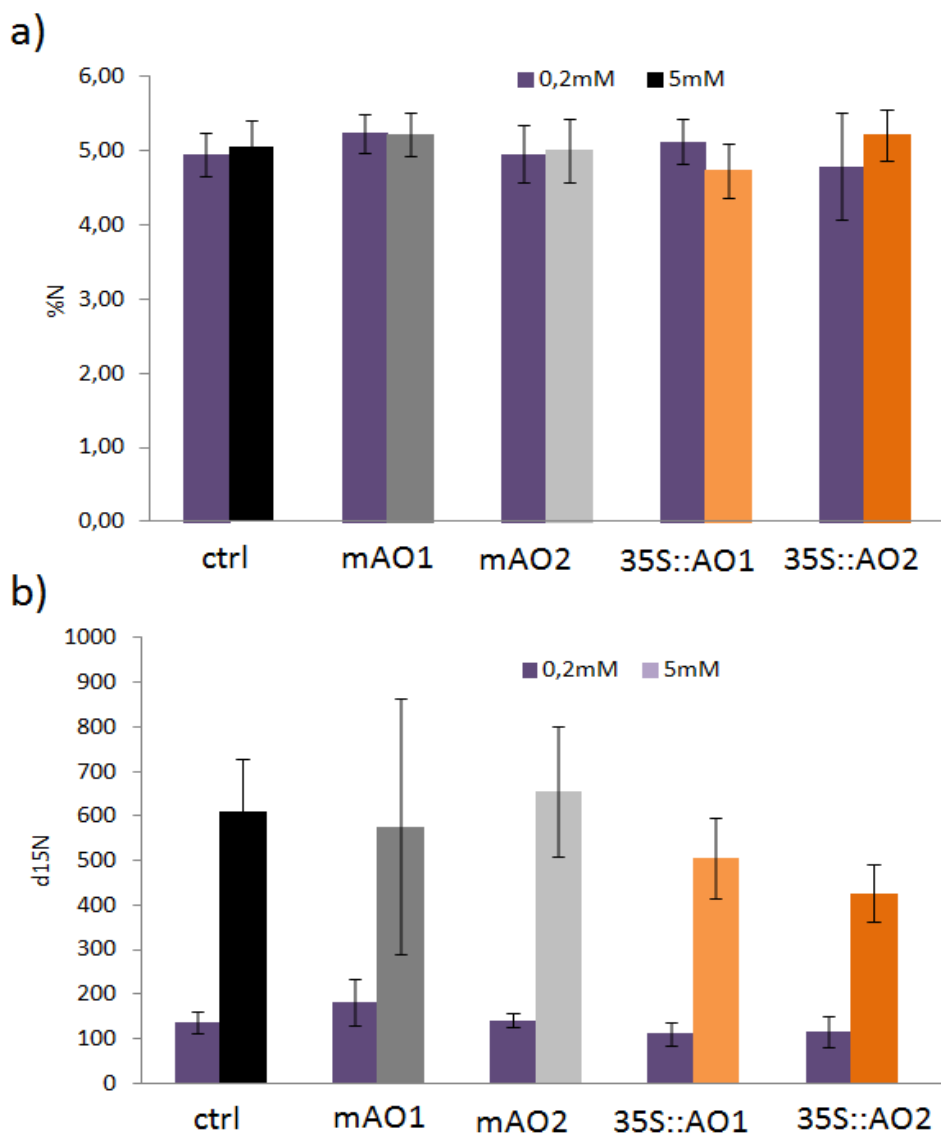


Figure 65 : Analyse racinaire du pourcentage d'azote et de l'abondance naturelle $d^{15}N$ avant et après au $K^{15}NO_3$ des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO et 35S::AO par EA-IRMS. a) pourcentage d'azote : histogramme violet : 0,2mM $K^{15}NO_3$, autre couleur : 5mM de $K^{15}NO_3$, b) $d^{15}N$: histogramme violet : 0,2mM $K^{15}NO_3$, autre couleur : 5mM de $K^{15}NO_3$. Les plantes ont été cultivées sur milieu hydroponique pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $120\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Les résultats représentent les moyennes de dix échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard.

VII- Discussion

La coordination des métabolismes du carbone et de l'azote est indispensable à une croissance harmonieuse des plantes. Comme une grande quantité d'azote est investie dans l'appareil photosynthétique, une assimilation optimale du CO₂ par la photosynthèse nécessite un apport suffisant en azote afin de produire de la biomasse. Dans l'autre sens, l'assimilation de l'azote inorganique nécessite des quantités significatives de carbone fixé pour fournir les squelettes carbonés accepteurs de l'azote pour la synthèse d'acides aminés, et d'importantes quantités d'ATP et d'équivalents réducteurs NAD(P)H sont requis pour conduire ce processus. Le NAD joue donc un rôle central dans cette coordination, et toute modification de ses teneurs ou de son état rédox est susceptible d'affecter les machineries du carbone et de l'azote, et par corolaire la croissance et le développement des plantes.

A- L'augmentation des teneurs en nucléotides à pyridine stimule les métabolismes carbonés et azotés de manière coordonnée

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les plantes riches en NAD ont des échanges gazeux amplifiés, ce qui se traduit par une augmentation de la biomasse et des rendements en graines. D'un point de vue métabolique, on constate un renforcement de la machinerie photosynthétique qui, associée à des niveaux d'équivalents réducteurs plus élevés, se traduit par une augmentation de la photosynthèse nette. En réalité, la photosynthèse brute est encore plus fortement augmentée, puisque l'activité respiratoire de ces plantes est très fortement stimulée, sans doute sous l'effet des teneurs en NAD(H) accrues. De cette assimilation du carbone amplifiée il résulte une augmentation du pourcentage de carbone dans les plantes, qui est reflétée par une accumulation de l'amidon transitoire. Si l'assimilation du carbone est augmentée, le métabolisme de l'azote semble également stimulé dans les feuilles, puisqu'on observe une augmentation de l'activité nitrate réductase dans ces organes, associée à une légère augmentation des pools d'ammonium. Cette assimilation des nitrates, probablement stimulée par une augmentation des pools de nitrates jusqu'ici inexpliquée, mais aussi des pools de NADH, conduit à une synthèse globalement maintenue voire supérieure des acides aminés. Cette synthèse d'acides aminés ne se fait pas au détriment de la respiration puisque les pools de citrate ne diminuent pas, en raison d'une augmentation de la voie

anaplérotique qui tire profit du PEP provenant de la glycolyse pour fournir malate et/ou l'oxaloacétate au cycle de Krebs. Outre l'activité PEPc qui est augmentée, on peut supposer que celle de la MDH associée à la voie anaplérotique est également stimulée par l'augmentation des niveaux de NADH. On constate même une augmentation significative des pools d'acides organiques (malate, citrate et fumarate). La glycolyse est probablement stimulée puisqu'on constate une augmentation des teneurs en Ala, et une tendance à la baisse des niveaux de glucose et de fructose est observée. L'augmentation des teneurs en NADH stimule la respiration cellulaire probablement à deux niveaux : (i) celui de la chaîne de transfert d'électron qui consomme du NADH pour synthétiser des molécules d'ATP, dont les teneurs augmentent dans ces plantes ; (ii) au niveau des étapes enzymatiques du cycle de Krebs et de la glycolyse qui produisent du pouvoir réducteur à partir de NAD(P)⁺ et/ou qui consomment de l'ATP. L'assimilation de l'ammonium en acides aminés semble maintenue, puisque les niveaux d'acides aminés majeurs comme le glutamate (Glu), la glutamine (Gln) et l'asparagine (Asn) sont inchangés. Tout au plus constate-t-on une augmentation de l'aspartate (Asp) qui est l'un des quatre acides aminés quantitativement majoritaires dans les tissus végétaux. Cela est peut-être à mettre en lien avec la stimulation de la biosynthèse de NAD à partir de cet amino-acide. Le ratio Gly /Ser conservé entre les plantes Ctrl et nos lignées riches en NAD, témoigne d'une activité photorespiratoire normale. L'élévation discrète des teneurs en ammonium observée résulterait donc plus d'une stimulation de l'assimilation primaire de l'azote dans les feuilles. En effet, si les teneurs en nitrates dans les plantes sont élevées, c'est sans doute pour répondre à un besoin accru d'assimilation primaire dans ces plantes. Curieusement, les expériences d'incorporation sur 5 min des nitrates marqués au ¹⁵N au niveau des racines n'ont pas permis de mettre en évidence une stimulation des transporteurs de nitrate racinaires. En tout état de cause, le pourcentage d'azote augmente dans les plantes. Des analyses métabolomiques et transcriptomiques réalisées à plus large échelle sont en cours pour étoffer notre compréhension de l'état métabolique général de ces plantes. Nous avons procédé à des analyses transcriptomiques sur puce CATMA qui se sont révélées infructueuses, malgré les vérifications des niveaux de transcrits marqueurs par PCR quantitative, probablement parce que la sonde CATMA de notre gène cible s'hybride aussi sur d'autres séquences contenant un domaine conservé succinate déshydrogénase, et retrouvé dans plusieurs gènes d'*Arabidopsis thaliana*.

Nous espérons obtenir des résultats d'analyse transcriptomique globale prochainement avec d'autres systèmes d'analyse. En résumé, les augmentations de teneur en NAD stimulent les métabolismes carbonés et azotés de manière coordonnée, ce qui permet de maintenir un développement harmonieux des plantes, qui accompagne une croissance et une production de biomasse stimulées

B- Le ménage à trois entre photosynthèse, respiration et assimilation de l'azote se déséquilibre lorsque les teneurs en NAD sont insuffisantes

A l'inverse des plantes 35S::AO, les mutants *mAO* montrent des niveaux de NAD réduits, accompagnés d'une légère oxydation des pools de glutathion. Cela s'accompagne d'un retard de croissance, d'un développement racinaire moindre et d'un rendement en graines plus faible. L'altération de la croissance observée chez ces plantes ne relève probablement pas d'une production de ROS plus importante, puisque des premières analyses menées en collaboration avec Anja Krieger-Liszkay du CEA de Saclay n'ont pas révélé de différences des niveaux de ROS foliaires mesurés par résonance paramagnétique des électrons (EPR). Pourtant, nous avons constaté qu'il était possible d'atténuer, voire d'annuler, le phénotype de retard de croissance de ces plantes, à faible lumière (données non montrées). Ces plantes auraient donc une limitation des teneurs en équivalents réducteurs qui ne leur permettrait pas de fournir suffisamment de NADPH pour la fixation du carbone. A l'appui de cette hypothèse, nous avons vu dans le chapitre précédent qu'à faible lumière (inférieure à 100 $\mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), l'assimilation nette (A) du mutant est alors supérieure à celle des plantes contrôle. La cause majeure du phénotype observé serait alors la limitation de la fixation du carbone et la difficulté à régénérer complètement les pools d'antioxydants comme le glutathion dans les plastides, à des intensités lumineuses normales pour *Arabidopsis thaliana*. On constate aussi que les pools de glucose et de fructose sont fortement augmentés dans les plantes mutantes appauvries en NAD, et que les niveaux d'acides organiques baissent, ceci s'accompagnant d'une baisse importante de l'activité respiratoire des plantes. Il est possible que chez ces mutants, la baisse des niveaux de NAD(P)⁺ et d'ATP constatée s'accompagne d'une baisse des activités enzymatiques clef de la glycolyse et aussi des étapes du cycle de Krebs utilisant le dinucléotide comme cofacteur. Outre la G3PDH, dont l'activité pourrait baisser sous

l'effet de la baisse des teneurs en NAD, ce seraient les niveaux d'ATP qui en baissant, provoqueraient une diminution de l'activité hexokinase et de la phosphofructokinase, menant à une accumulation de fructose et de glucose dans les feuilles. Ces deux enzymes joueraient en effet un rôle central dans la coordination entre la production de sucres et la photosynthèse (Granot et al., 2013). Ainsi, dans le mésophylle des tissus photosynthétiques, l'hexokinase inhiberait la photosynthèse en inhibant l'expression des gènes photosynthétiques et diminuant la synthèse de chlorophylle, lorsque les niveaux de glucose seraient suffisamment élevés (Jang et al., 1997; Dai et al., 1999; Moore et al., 2003; Kelly et al., 2012). L'hexokinase pourrait aussi intervenir dans la fermeture des stomates, limitant les échanges gazeux, mais cette activité serait dépendante de l'ABA, donc dépendante de l'établissement d'un stress hydrique ou d'une production de ROS (Kelly et al., 2013). Un mutant hexokinase1 d'*Arabidopsis thaliana* montre, comme chez notre mutant *mAO* aux niveaux de NAD diminués, une réduction de croissance des parties aériennes et racinaires en réponse à des intensités lumineuses élevées (Morre et al., 2003). Les teneurs en citrate baissent dans les plantes mutantes *mAO*. Cette observation est à rapprocher de la baisse de l'activité PEPc de la voie anaplérotique, qui pourrait entraîner des difficultés de réapprovisionnement en citrate lorsque celui-ci est exporté pour produire de l' α -cétoglutarate pour la biosynthèse des acides aminés par la voie GS-GOGAT. On constate également une diminution très significative du ratio Gly/Ser, indiquant une possible augmentation de l'activité photorespiratoire de ces plantes. L'assimilation primaire de l'azote serait affectée, puisque les pools de nitrates et d'ammonium baissent concomitamment avec une forte diminution des transcrits *NR*, et il en résulte une baisse globale des niveaux d'acides aminés, en particulier de la Glu, de l'Asn, de l'arginine (Arg), de l'Asp et ses dérivés. On constate aussi une baisse de la production d'Ala, à mettre en lien avec la probable diminution de la glycolyse, et on notera aussi une diminution des teneurs en Trp, acide aminé indolique précurseur entre autre de l'auxine et des indoles glucosinolates, molécules dont nous parleront dans les chapitres suivants. Pour résumer, la diminution des niveaux de NAD dans les mutants *mAO* d'*Arabidopsis thaliana* entrainerait une diminution de la photosynthèse et de la glycolyse, limitant les étapes ultérieures respiratoires et de synthèse d'acides aminés en squelettes carbonés.

Chapitre V

Impact des niveaux de NAD sur la résistance aux stress abiotiques chez *Arabidopsis thaliana*

Les analyses physiologiques et métaboliques des lignées aux teneurs en NAD altérées ont permis de mettre en évidence une modification des grandes fonctions métaboliques des plantes en conditions normales de culture. Les éléments donnés dans la littérature suggèrent qu'il existe un lien fort entre homéostasie énergétique et résistance aux conditions adverses de l'environnement. Pour investiguer cette problématique, l'analyse de lignées aux teneurs variés en NAD a été étendue à différents stress abiotiques.

I- Les plantes riches en NAD sont plus résistantes à un stress chaleur/lumière

Les données de la littérature ont montré que lorsque la surconsommation de NAD par les plantes était empêchée dans des situations de stress extrêmes, les plantes parvenaient à survivre (De Block et al., 2005). Nous avons par conséquent appliqué un stress combiné forte lumière/forte chaleur, proche des conditions décrites dans la littérature, afin de mettre à l'épreuve nos plantes riches en NAD. Comme décrit ci-dessous **figure 66**, des plantes sauvages d'*Arabidopsis thaliana* âgées de huit semaines sont soumises à une forte intensité lumineuse ($350 \mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$) et une température de 37°C , en maintenant un approvisionnement en eau constant. Les plantes Ctrl sont fortement détériorées après une semaine de traitement (**Figure 66**). A l'inverse, les plantes 35S::AO riches en NAD sont peu sensibles aux conditions abiotiques extrêmes de cette expérience (**Figure 66**). A condition de maintenir irriguées les plantes, l'augmentation des teneurs en NAD protège les plantes face à des conditions abiotiques extrêmes.



Figure 66 : Photographie représentative d'une plante contrôle Ctrl (à gauche) et une plante 35S::AO (à droite) d'*Arabidopsis thaliana* cultivées après une semaine sous forte lumière ($350 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et forte température (37°C). Le cliché représente des plantes âgées de 8 semaines cultivées en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ avant l'établissement du stress.

II- Les niveaux de NAD influencent la résistance des plantes à la sécheresse

A condition d'une disponibilité suffisante en eau, les plantes riches en NAD sont plus résistantes à des conditions extrêmes de culture. Cependant, nous savons qu'elles transpirent plus et que leur efficacité d'utilisation de l'eau est plus faible (voir chapitre III). Or, la contrainte hydrique est un véritable enjeu en agronomie. Dans le but d'étudier l'effet des teneurs en NAD sur la résistance des plantes au stress hydrique, nous avons entrepris des cinétiques de déshydratation des lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* dérégulées pour la production d'AO.

Huit jours après la mise en place du stress, 20% des plantes contrôle sont desséchées, et la plupart d'entre-elles commencent à flétrir. Le lendemain, 100% des plantes sont flétries et à 11 jours toutes les plantes sont mortes. Dès huit jours, 100% des plantes 35S::AO riches en NAD sont desséchées (**Figure 67**). La lignée *mAO*, appauvrie en NAD, survit jusqu'à 17 jours après application de la contrainte hydrique.

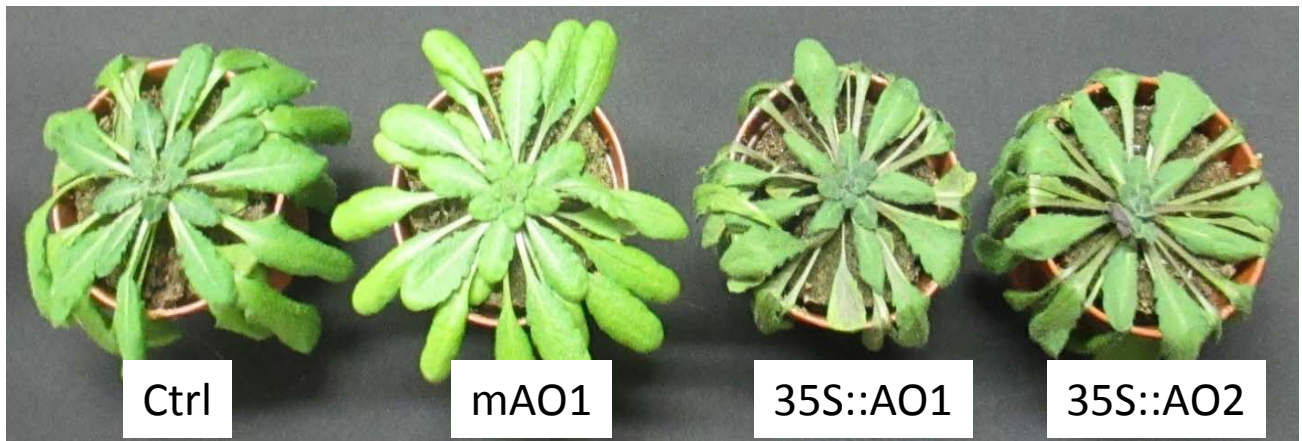


Figure 67 : Photographie représentative d'une plante contrôle Ctrl, une plante *mAO1* une plante *35S::AO1* et une plante *35S::AO2* d'*Arabidopsis thaliana* cultivées après 8 jours de stress hydrique. Le cliché représente des plantes âgées de 6 semaines cultivées en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$ avant l'établissement du stress.

Une cinétique du statut hydrique (déficit hydrique et contenu relatif en eau), du potentiel hydrique et du profil hormonal des plantes, en parallèle du contenu hydrique du sol, a alors été entreprise à 0, 6, 9, et 12 jours. Le premier point de la cinétique, J-0, consiste au début du stress, établi 6 semaines après repiquage. Le deuxième point, J-6, est un temps intermédiaire positionné avant l'apparition des symptômes de flétrissement des plantes les moins résistantes au stress hydrique, les lignées *35S::AO*, et pour lesquelles on veut observer comment varient les hormones, l'ABA notamment. Associé au profilage hormonal, le contenu relatif en eau (RWC) des plantes et des pots a été estimé. Puis le point suivant est réalisé à J-9, lorsque les plantes *35S::AO* et les plantes Ctrl sont desséchées mais sont capables de reviviscence après hydratation. Enfin, un dernier point de cinétique est réalisé à J-12, date à laquelle les lignées *35S::AO* et Ctrl ne sont mortes. Notons que 12 jours après le début du stress, les plantes *mAO* commencent à avoir des symptômes de flétrissement. Afin de se rendre compte de l'état hydrique des plantes, le contenu relatif en eau (ou RWC pour « relative water content ») des plantes a été estimé. Pour cela, des disques foliaires ont été prélevés, pesés, hydratés pendant 24h, pesés à nouveau, puis séchés à l'étuve à 50°C pendant 48h avant d'être à nouveau pesés. Ce paramètre est le plus utilisé pour définir l'état hydrique de la plante (Tardieu et al., 1993; Hummel et al., 2010).

1) Le **contenu relatif en eau (RWC)** a été défini avec la formule suivante :

$$\text{RWC (\%)} = \frac{\text{masse fraîche} - \text{masse sèche}}{\text{masse turgescente} - \text{masse sèche}} \times 100$$

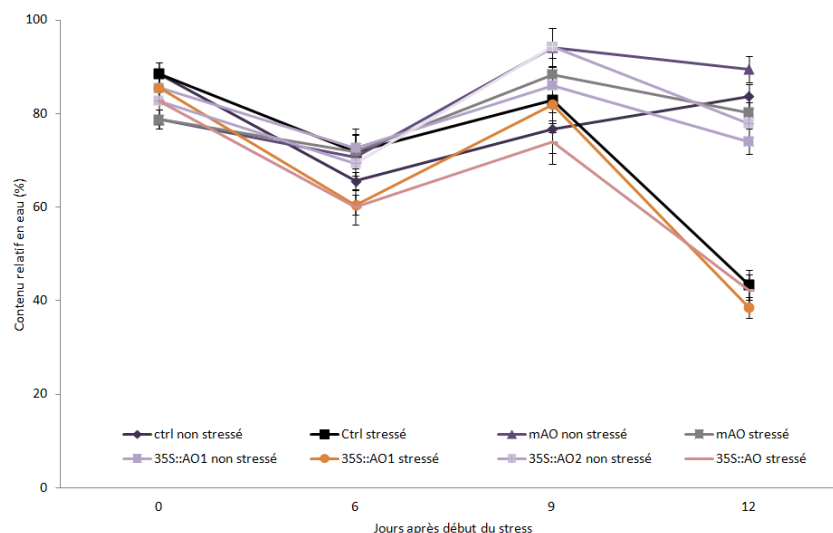


Figure 68 : Cinétique du contenu relatif en eau (RWC) des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO1 et 35S::AO1 et 2 au cours du stress hydrique. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. La mise en place du stress hydrique est réalisée au bout de 6 semaines. Les résultats représentent les moyennes de deux expériences indépendantes sur six échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard.

Les résultats montrent que le contenu relatif en eau des plantes témoins est relativement stable et fluctue aux alentours de 80%, quel que soient les lignées. La réponse des plantes Ctrl au stress hydrique semble être bi-phasique. Tout d'abord il y a une diminution du RWC 6 jours après le début du stress, atteignant alors une valeur de 72%, avant de retrouver sa valeur initiale 9 jours après le début du stress (**Figure 68**). Notons qu'à 9 jours après le début du stress, si on réhydrate les plantes, celles-ci sont capables de révigescence. 12 jours après le début du stress, les plantes Ctrl atteignent un point de non-retour et le RWC chute alors drastiquement à 43%. En ce qui concerne les plantes de la lignée 35S::AO, la réponse bi-phasique est davantage marquée. Ainsi, dès 6 jours après le début du stress, le RWC atteint 60%. 12 jours après le début du stress le RWC est de 38 et 42% pour les lignées 35S::AO1 et 35S::AO2 respectivement, et les plantes ne sont plus capables de

réviviscence. Le contenu relatif en eau de la lignée *mAO* testée conserve la même valeur de 80% sur les 12 jours de stress hydrique. La capacité des plantes mutantes à maintenir le contenu relatif en eau élevé pourrait expliquer la résistance de ces lignées à la contrainte hydrique.

2) La **teneur en eau** se définit par la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{\text{masse fraîche} - \text{masse sèche}}{\text{masse fraîche}} \times 100$$

Elle a été définie en parallèle du RWC et constitue aussi un paramètre important de l'état hydrique des plantes. Pour toutes les lignées, en conditions non stressées, la teneur en eau est de l'ordre de 90% (**Figure 69**). La teneur en eau suit des tendances similaires au RWC. Ainsi, chez le Ctrl, la teneur en eau diminue très fortement (de 15%) 12 jours après le début du stress. Les lignées 35S::AO suivent la même tendance que les plantes Ctrl (**Figure 69**). Les plantes *mAO* conservent leur teneur en eau tout au long du stress appliqué.

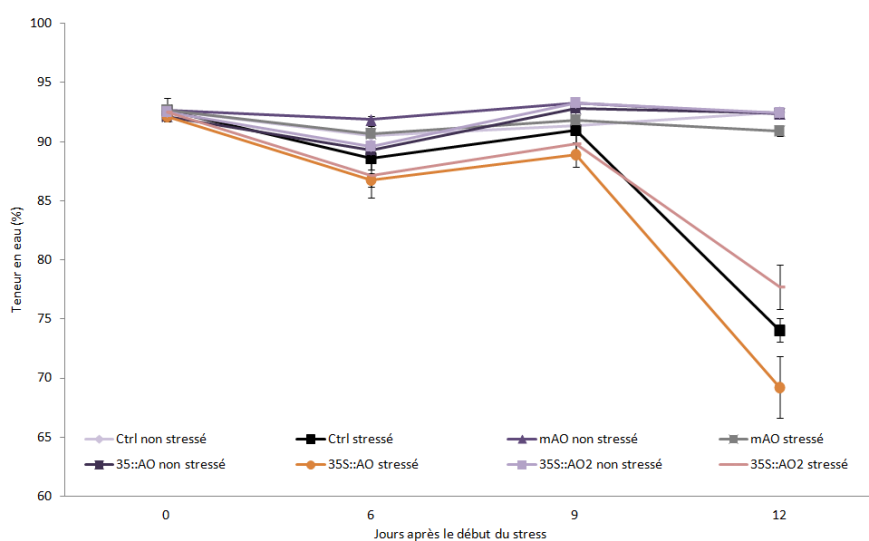


Figure 69 : Cinétique de la teneur en eau des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et 35S::AO1 et 2 au cours du stress hydrique . Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines (Ctrl et 35S::AO) ou 7 semaines (*mAO*) en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. La mise en place du stress hydrique est réalisée au bout de 6 ou 7 semaines. Les résultats représentent les moyennes de deux expériences indépendantes sur six échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard.

Les plantes 35S::AO se déshydratent plus vite les six premiers jours que les Ctrl, mais ensuite elles récupèrent un contenu en eau équivalent. Cela se passe comme si ces plantes qui échangent plus avec le milieu prenaient plus de temps à mettre en place les réponses de clôture de stomates à la sécheresse.

3) Le **potentiel hydrique** est une mesure de l'avidité en eau d'un compartiment biologique. Plus il est élevé (moins négatif) dans un compartiment, et plus l'eau a tendance à le quitter. Inversement, l'eau a tendance à rentrer dans les compartiments ayant un faible potentiel hydrique (très négatif). En collaboration avec Gabriel Cornic du laboratoire Ecologie Systématique Environnement de l'Université Paris-Sud, nous avons entrepris des mesures du potentiel hydrique foliaire des lignées d'*Arabidopsis thaliana* à l'aide d'un appareil de mesure de potentiel hydrique WP4-T Dewpoint (Decagon Devices, Pullman, USA). Chez *Arabidopsis thaliana*, le potentiel hydrique des plantes cultivées en condition normales d'hydratation oscille autour de -0,9 MPa. Jusqu'à 6 jours de stress hydrique, on n'observe aucune variation de ce potentiel entre les différentes lignées. Le stress hydrique entraîne une diminution du potentiel hydrique des plantes Ctrl et 35S::AO lorsque celles-ci flétrissent. Il semble que les plantes 35S::AO soient capables d'abaisser plus fortement leur potentiel hydrique, à -1,8MPa, contre -1,6MPa pour les plantes Ctrl (**Figure 70**). Chez les plantes mutantes qui ne flétrissent pas jusqu'à 12 jours, on observe cependant un léger abaissement du potentiel hydrique à environ -1,1 MPa (**Figure 70**), qui traduit la résistance des plantes à la contrainte hydrique.

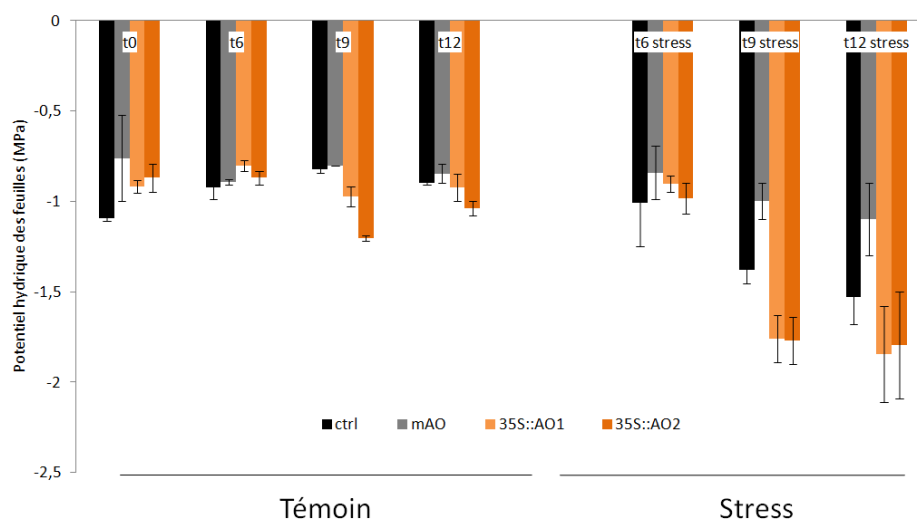


Figure 70 : Potentiels hydriques foliaires (mesurés en MPa) des différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* Ctrl, mAO et 35S::AO au cours du stress hydrique . Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines (Ctrl et 35S::AO) ou 7 semaines (mAO) en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100\mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. La mise en place du stress hydrique est réalisée au bout de 6 ou 7 semaines. Les résultats représentent les moyennes de trois échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard.

III- La mesure du contenu en eau du sol

La mesure du contenu en eau du sol permet de suivre en parallèle de la perte en eau de la plante, la teneur en eau du sol. Le contenu en eau du sol s'exprime ici en % (**Figure 70**). Les sols normalement hydratés contiennent de 55% à 60% d'eau en moyenne. Les résultats montrent que le contenu relatif en eau du sol chute progressivement à 50% pour tous les pots après 6 jours de stress hydrique. Pour les pots à plantes Ctrl et 35S::AO, le contenu en eau du sol chute à 40% à 9 jours, stade où les plantes sont toutes flétries, et à moins de 30% à 12 jours, stade auquel les plantes sont mortes. Les sols des pots contenant les plantes mutantes mAO ont un pourcentage en eau stable jusqu'à 12 jours, confirmant que les plantes appauvries en NAD ne transpirent quasiment pas (**Figure 71**).

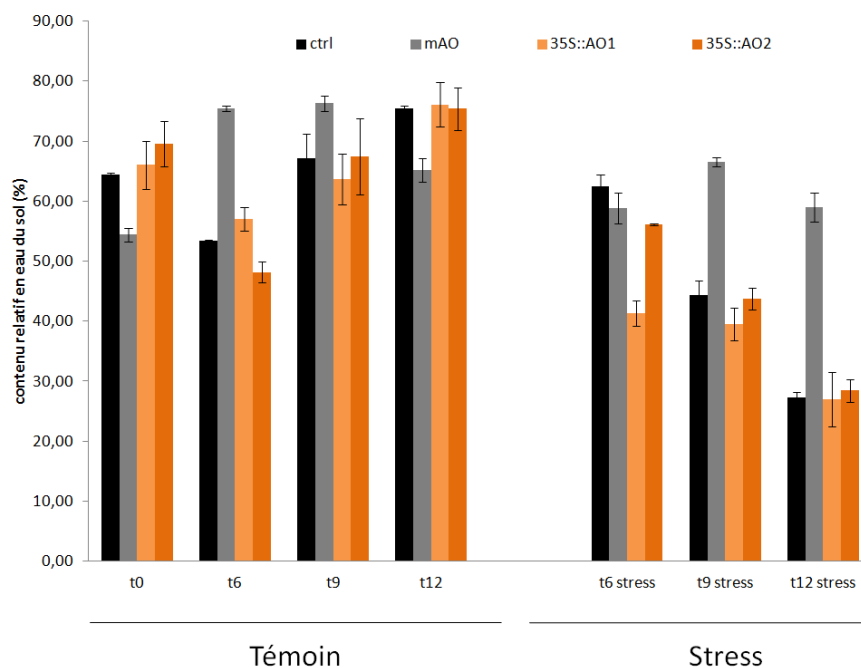


Figure 71 : Contenus relatifs en eau du sol des pots (exprimés en %) ayant contenus les différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* Ctrl, mAO et 35S::AO au cours de la cinétique de déshydratation.

IV- La réponse différentielle des plantes au stress hydrique s'accompagne d'une modification du profil hormonal

La réponse à la contrainte hydrique se traduit dans les feuilles par une fermeture des stomates médiée par l'acide abscissique ou ABA (Allen et al., 2001) (Allen et al., 2001). C'est pourquoi nous avons complété l'analyse de la cinétique de stress hydrique par un profilage hormonal/ de métabolites secondaires par LC-MS en collaboration avec Florence Guérard de la Plateforme Métabolisme Métabolome. L'ABA est un terpénoïde qui intervient surtout dans la régulation de la germination des graines, dans l'induction des protéines de réserves et dans la réaction aux stress hydriques. En particulier, l'ABA est connu pour contrôler la fermeture des stomates selon une signalisation dépendante de la production de ROS et de cADPR (Allen et al., 2001; Kwak et al., 2003). Les analyses réalisées sur les lignées d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress hydrique révèlent une forte induction de la production d'ABA à 6 jours dans les plantes Ctrl et 35S::AO (Figure 72). A 9 jours de stress hydrique, cette induction se poursuit dans les plantes surproduisant le NAD, alors que les niveaux d'ABA baissent déjà dans les plantes Ctrl. A 12 jours, lorsque

les plantes Ctrl et 35S::AO meurent, les niveaux d'ABA ont retrouvé des valeurs normales. On observe aussi chez le mutant *mAO* une induction progressive de la production d'ABA, sensible depuis 9 jours de stress hydrique (**Figure 72**). La production d'ABA accompagne donc la déshydratation des plantes et celle-ci est maintenue plus forte jusqu'à 9 jours chez les plantes surproduisant du NAD.

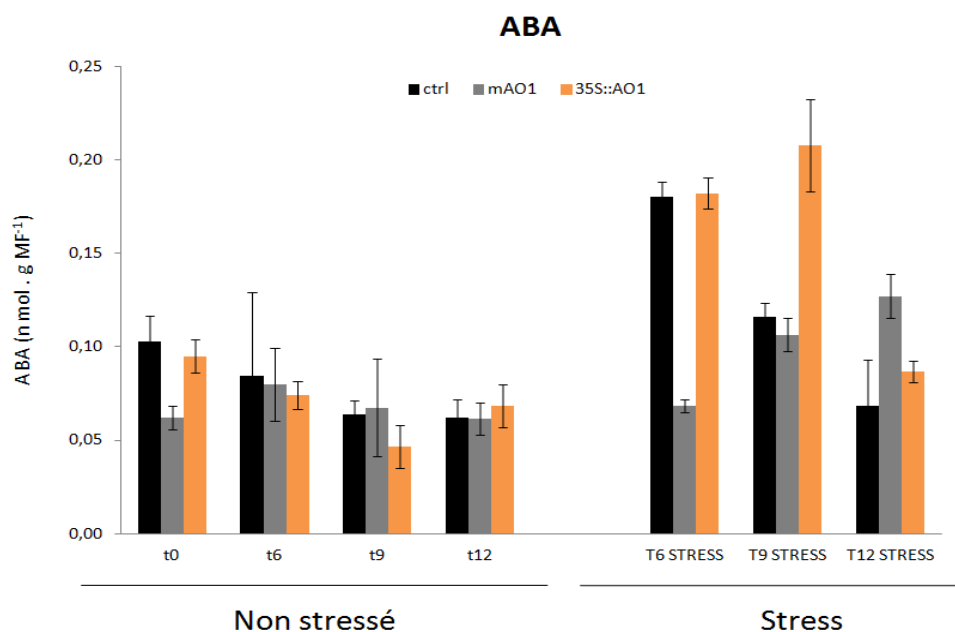


Figure 72 : Teneur en acide abscissique (ABA) des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et 35S::AO au cours du stress hydrique par LC-MS . Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100 μ moles photons m².s⁻¹. La mise en place du stress hydrique est réalisée au bout de 6 semaines. Les résultats représentent les moyennes de trois échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard.

Les cytokinines sont des dérivés substitués en N⁶ de l'adénine. La zéatine est la cytokinine naturelle la plus répandue chez les plantes supérieures. Elle peut être associée à un riboside en position 9. En plus de la stimulation des divisions cellulaires, les cytokinines interviennent notamment sur la différenciation des chloroplastes et la sénescence des feuilles (Ha et al., 2012). Les analyses réalisées sur les lignées d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress hydrique, révèlent une induction de la production de zéatine qui accompagne la progression de la déshydratation, et qui se manifeste dès 6 jours chez les plantes contrôle et 35S::AO, sans différence significative entre ces génotypes (**Figure 73a**). La production de

zéatine riboside est induite dès 6 jours chez les plantes 35S::AO, et semble suivre la même tendance de production que la zéatine parmi tous les génotypes (**Figure 73b**).

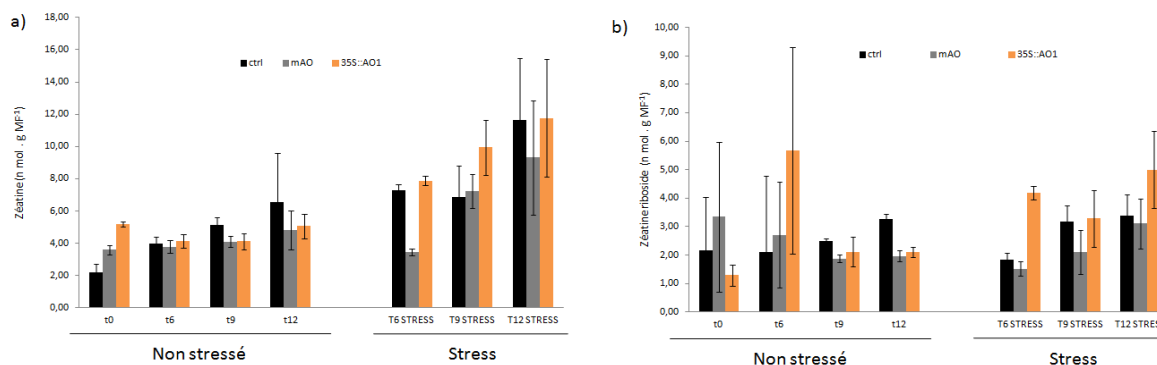


Figure 73 : Teneur en a) zéatine ; b) zéatine riboside des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO et 35S::AO au cours du stress hydrique par LC-MS. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100 μ moles photons m².s⁻¹. La mise en place du stress hydrique est réalisée au bout de 6 semaines. Les résultats représentent les moyennes de trois échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard.

L'acide indole acétique ou IAA est l'auxine naturelle la plus répandue chez les plantes supérieures. Elle est principalement produite dans les cellules de l'apex caulinaire et dans les jeunes feuilles des plantes. Elle induit l'élongation cellulaire et les divisions cellulaires et sert de molécule signal nécessaire au développement des organes et à la coordination de la croissance des plantes. On observe une accumulation foliaire d'IAA chez les mutants *mAO1* appauvris en NAD, sans distinction de conditions de cultures (**Figure 74**). Une diminution des teneurs en NAD semble induire une production d'auxine dans les feuilles.

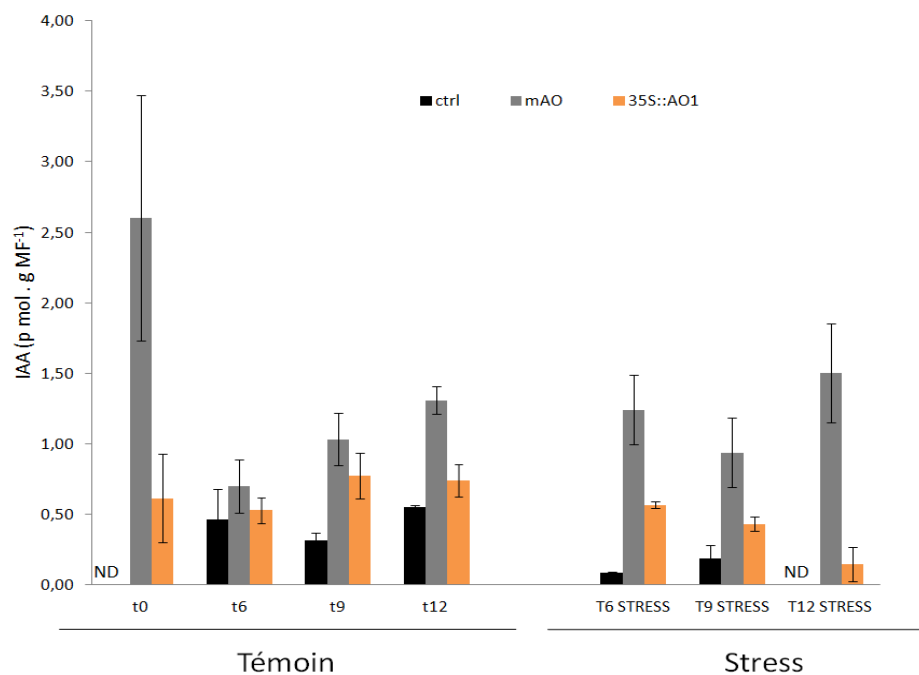


Figure 74 : Teneur

en acide indole acétique (IAA) des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO et 35S::AO au cours du stress hydrique par LC-MS. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100µmoles photons m².s⁻¹. La mise en place du stress hydrique est réalisée au bout de 6 semaines. Les résultats représentent les moyennes de trois échantillons indépendants par génotype ± l'erreur standard.

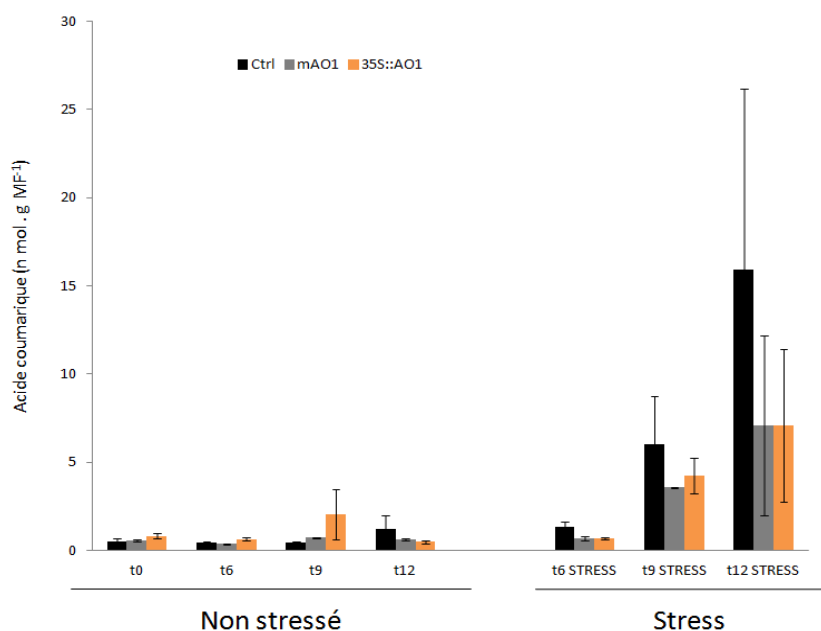


Figure 75 : Teneur

en acide coumarique des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO et 35S::AO au cours du stress hydrique par LC-MS. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100µmoles photons m².s⁻¹. La mise en place du stress hydrique est réalisée au bout de 6 semaines. Les résultats représentent les moyennes de trois échantillons indépendants par génotype ± l'erreur standard.

L'acide coumarique est un acide hydroxycinamique dérivé de la phénylalanine et qui intervient dans les réactions de défenses des plantes. C'est aussi le précurseur de la lignine, des flavonoïdes et isoflavonoïdes. Les analyses réalisées sur les lignées d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de stress hydrique révèlent une induction progressive de la production d'acide coumarique au cours de l'expérience du stress hydrique, et ce indépendamment du génotype considéré (**Figure 75**).

V- Discussion

Les données de la littérature suggèrent qu'il existe chez les plantes un lien entre homéostasie du NAD, maintien des niveaux de NAD et leur résistance aux stress abiotiques (De Block et al., 2005; De Block & Van Lijsebettens, 2011). Elles suggèrent en outre un rôle de la biosynthèse du NAD dans la réponse des plantes à la contrainte hydrique en participant à la fermeture des stomates (Leckie et al., 1998; Hashida et al., 2009).

A- Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* adaptées au climat tropical ?

Si les performances en terme de rendement en graines et de production de biomasse chez les plantes riches en NAD sont impressionnantes, des paramètres physiologiques comme la fixation de CO_2 aux fortes intensités lumineuses (voir chapitre III) prédisent que ces plantes peuvent supporter des conditions de luminosité et de température plus proches des conditions tropicales (saison humide) que celles auxquelles l'espèce *Arabidopsis thaliana* est adaptée. Pour répondre à cette question, nous avons cultivé nos lignées 35S::AO dans des conditions de forte intensité lumineuse ($350 \mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$) et à la température de 37°C , tout en maintenant un approvisionnement optimal en eau. Ces conditions de fortes lumière/chaaleur sont souvent fatales à des plantes qui, comme *Arabidopsis thaliana*, ont un optimum de croissance à des températures comprises entre 23 et 25°C pour une intensité lumineuse allant de 130 à $150 \mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$. Dans ces conditions « tropicales », l'effet de la chaleur est compensé par une augmentation de la conductance stomatique et de la respiration chez les plantes adaptées (Mittler, 2006). Or chez les plantes riches en NAD, ces paramètres sont déjà élevés, ce qui pourrait rendre compte de la résistance des plantes 35S::AO à ces conditions. La présence combinée de plus de Rubisco, plus de chlorophylle et plus de NAD dans ces plantes, leur permet probablement de supporter un plus fort flux d'électrons sur la chaîne de transfert chloroplastique utilisé par le cycle de Calvin pour la fixation du

carbone. De plus forts niveaux de NAD facilitent la détoxification des ROS produites à la lumière dans les chloroplastes (Sunkar et al., 2003; Apel & Hirt, 2004; Mano et al., 2005; Noctor, 2006), et les niveaux de NAD permettent de renouveler plus activement les molécules de chlorophylle (Chai et al., 2005), limitant les dommages sur l'appareil photosynthétique lorsque les intensités lumineuses sont fortes. En augmentant constitutivement la teneur en NAD des plantes d'*Arabidopsis thaliana*, nous les avons rendues plus adaptées à des conditions environnementales inhabituelles pour cette espèce végétale, qui sont plus proches des saisons humides des climats tropicaux que des conditions tempérées rencontrés sous nos latitudes. Pour valider cette assertion, il conviendrait cependant de vérifier quels sont les nouveaux optimum de température et de luminosité des lignées 35S::AO. Par ailleurs, il est également possible que ces plantes soient plus résistantes à d'autres stress température, le métabolisme du NAD semblant par exemple impliqué dans la résistance au froid (Kuraishi et al., 1968; Ruiz et al., 2002).

B- Des plantes légèrement plus sensibles à la sécheresse mais plus résistantes au stress hydrique ?

Le stress hydrique est un des enjeux les plus importants des végétaux depuis que ceux-ci ont colonisé le milieu terrestre. Bien que l'eau soit abondante sur Terre, l'eau douce est rare, et l'eau présente dans les sols représente une forte limitation ainsi qu'une pression de sélection continue sur les écosystèmes terrestres (Bray, 2013). Les plantes vasculaires transpirent classiquement entre 100 g et 1000 g d'eau par gramme de matière organique sèche formée. Ce maigre rendement de la fixation carbonée s'explique par l'énorme différence de potentiel hydrique entre l'intérieur des feuilles et l'atmosphère, et au contraire la maigre différence de pression partielle de CO₂. La fixation du CO₂ nécessite l'ouverture des stomates, alors que les pertes en eau en sont une inévitable conséquence.

Inévitablement donc, les plantes qui transpirent plus pour fixer du carbone sont désavantagées en situation de stress hydrique. A l'inverse, des plantes qui fixent peu le carbone et qui du coup échangent peu d'eau avec l'atmosphère, sont avantagées dans ces mêmes conditions. Ainsi, observons-nous une forte résistance des plantes mutantes *mAO* après arrêt de l'arrosage des pots. Les contenus en eau

du sol et des feuilles diminuent très peu au cours du temps, confirmant les mesures de transpiration qui indiquent que celle-ci est très faible (voir chapitre III). Cependant, une fois un certain seuil de déshydratation franchi, les plantes *mAO* meurent comme celles des autres lignées. Nous avons ainsi observé un délai de 6 jours pour toutes les lignées, entre l'apparition des premiers signes morphologiques de déficit hydrique et la mort des plantes. On pourrait penser que c'est la plus faible vitesse de croissance qui conduirait à une meilleure résistance à la sécheresse. Cependant, les données de la littérature indiquent que d'autres plantes mutantes à croissance diminuée sont pourtant plus sensibles au stress hydrique (Catala et al., 2007). Il n'est en outre pas certain que ce type de mutant *mAO* soit plus résistant en champ à une sécheresse, puisque la sécheresse s'accompagne d'un dessèchement rapide des couches superficielles du sol, et que les plantes mutantes ont un appareil racinaire moins développé (voir chapitre I).

Le contenu relatif en eau des rosettes exprime un équilibre entre deux processus, (i) la régulation des pertes en eau au niveau des feuilles par transpiration (stomatique et cuticulaire), et (ii) les capacités d'absorption de l'eau dans la réserve utile du sol. En supposant que les pertes en eau du sol par évaporation soient sensiblement équivalentes pour les trois lignées, les différences de pertes en eau journalières des pots traduisent principalement une variabilité de transpiration. Les plantes riches en NAD subissent une première déshydratation entre le premier et le sixième jour après arrêt de l'arrosage, puis leur teneur en eau ré-augmente légèrement au neuvième jour où les plantes recouvrent le même état hydrique que les plantes Ctrl. A ce stade, les plantes qui ont recouvré un contenu relatif en eau supérieur à celui du sixième jour, flétrissent pourtant. Cette variation biphasique du contenu relatif en eau au cours de la déshydratation est classiquement retrouvée dans la littérature (Poulson et al., 2006). Le flétrissement résulterait d'une baisse importante du contenu en eau des plantes qui n'arrivent plus à abaisser suffisamment leur potentiel osmotique pour attirer l'eau vers la plante. On remarque que les plantes riches en NAD abaissent davantage leur potentiel hydrique, ce qui suggère qu'elles sont capables d'un plus fort ajustement osmotique que les plantes Ctrl. Pour autant, ces plantes riches en NAD flétrissent légèrement plus vite que les plantes Ctrl. Un suivi plus détaillé et simultané des potentiels hydriques foliaires et édaphiques entre 9 et 12 jours après l'arrêt d'arrosage permettrait de répondre à

cette question. Les plantes 35S::AO qui sont plus riches en NAD, apparaissent plus sensibles à la sécheresse car elles poussent plus vite donc transpirent plus, mais sont probablement plus capables d'abaisser leur potentiel hydrique pour puiser l'eau du sol. En effet, lorsque la quantité d'eau au niveau du sol diminue, le potentiel hydrique foliaire nécessaire pour provoquer le mouvement d'eau depuis le sol jusqu'aux feuilles doit être d'autant plus faible (Lacaze, 2006). Ces plantes riches en NAD seraient donc plus performantes à stress hydrique équivalent. Afin de valider cette hypothèse, nous envisageons de réaliser des expériences de culture des différentes lignées sur milieux contenant des solutés non perméants comme le polyéthylène glycol et le mannitol.

Dans le cas d'abaissement du potentiel hydrique, la tolérance des plantes s'exprime par un maintien de la turgescence, rendue possible grâce au phénomène d'ajustement osmotique, qui est lié à la capacité du végétal à accumuler certains solutés (Blum, 2005). L'ajustement osmotique permet une protection des membranes et des systèmes enzymatiques (Santarius, 1973), en particulier au niveau des organes jeunes (Morgan, 1992), et intervient en retardant la sénescence foliaire et en améliorant l'extraction de l'eau par les racines (Turner, 1997). Il permet de maintenir la conductance stomatique et la photosynthèse à des potentiels hydriques foliaires bas, ce que nous n'avons pas pu vérifier au cours de nos cinétiques, les appareils de mesure d'échanges gazeux étant malencontreusement tombés en panne. Parmi les osmorégulateurs dont l'accumulation permet la diminution du potentiel osmotique, nous avons mesuré chez les plantes riches en NAD une augmentation des niveaux de nitrates et d'acides organiques. En effet, les nitrates jouent chez certaines espèces végétales comme le tournesol, un rôle important en cas de stress hydrique (Jones et al., 1980). Aussi, les acides organiques comme l'acide malique, quantitativement important chez la plupart des espèces cultivées (Clark, 1969), contribuerait à l'abaissement du potentiel osmotique chez le sorgho (Newton et al., 1986).

C- La résistance à la sécheresse est conditionnée par l'antagonisme ABA-cytokinines ?

Les stomates sont de petits pores qui interrompent la continuité de l'épiderme et de la cuticule qui le recouvre. Leur degré d'ouverture conditionne les échanges gazeux entre la feuille et le milieu extérieur, et contrôle en particulier les échanges d'eau. Les stomates sont ainsi en première ligne pour éviter les pertes d'eau par les plantes en situation de contrainte hydrique. Deux mécanismes principaux régulent la fermeture des stomates, (i) un mécanisme hydroactif sous la dépendance du métabolisme qui implique des flux ioniques, et (ii) l'abaissement du potentiel hydrique qui implique l'ABA, en situation de stress hydrique (Wilkinson & Davies, 2008). Au cours d'un épisode de sécheresse, la synthèse d'acide abscissique (ABA) est stimulée dans les racines et dans les feuilles (Tardieu et al., 1993; Zhang & Outlaw, 2001; Gutschick and Simonneau, 2002; Osakabe et al., 2014). L'ABA qui s'accumule dans les tissus vasculaires est transporté aux cellules de garde par diffusion passive en réponse aux changements de pH, ainsi que par des transporteurs spécifiques, dont certains sont de la famille des transporteurs de nitrates (Kang et al., 2010 ; Kumori et al., 2010 ; Osakabe et al., 2014). A l'inverse, les cytokinines ont une action antagoniste de celle de l'ABA, puisque leur application exogène à des plantes provoque une ouverture des stomates et une augmentation de la transpiration foliaire (Pospilova et al., 2011). Si en réponse à un stress hydrique modéré ou réalisé sur des temps courts on constate une augmentation des teneurs en cytokinines, lors de stress plus intenses ou prolongés, les niveaux de cytokinines chutent (Havlova et al., 2008 ; Nishiyama et al., 2011 ; Kudoyavova et al., 2007)

La production d'ABA par les plantes régule négativement celle des cytokinines (Nishiyama et al., 2011 ; Vaseva et al., 2008), et des mutants affectés dans la biosynthèse ou la signalisation dépendante des cytokinines sont plus tolérants aux stress hydriques (Nishiyama et al., 2011). Cependant, cette augmentation de résistance au stress hydrique serait due plus à une activation des gènes sous le contrôle de la signalisation ABA et à l'augmentation de l'intégrité des membranes qu'à une différence de fermeture des stomates (Nishiyama et al., 2011; Ha et al., 2012) .

Nos résultats confirment une induction transitoire et très forte des niveaux d'ABA chez les plantes les moins résistantes au stress hydrique, et qui reste longtemps élevée chez les lignées 35S::AO riches en NAD. On constate qu'au moment où les plantes meurent, les teneurs en ABA sont abaissées chez ces plantes, alors qu'elles continuent d'augmenter progressivement chez les lignées *mAO* pauvres en NAD, pour lesquelles un stress hydrique est en train de s'installer. Les teneurs en zéatine, principale cytokinine chez *Arabidopsis thaliana*, augmentent tout le long du stress jusqu'à la mort de la plante. Lorsque les plantes meurent, on constate une évolution antagoniste des niveaux d'ABA qui baissent et de cytokinines zéatine et zéatine-riboside, laquelle s'accompagne d'une drastique diminution du contenu en eau des plantes. Ceci suggère que les stomates ne sont plus maintenus fermés dans les stades ultimes du stress hydrique.

Le profilage métabolomique qui nous a permis de suivre les teneurs en ABA et en cytokinines, nous a aussi permis d'identifier une tendance à la baisse de l'IAA lors du stress hydrique. Surtout, l'auxine (IAA) s'accumule très fortement chez les lignées *mAO* pauvres en NAD. Cette accumulation d'IAA s'accompagne d'une diminution des teneurs en son précurseur, le tryptophane (voir chapitre précédent). Un autre composé du métabolisme secondaire des plantes, l'acide coumarique, augmente de façon importante avec le stress des plantes dans l'ensemble des lignées. Ce composé de la voie des phénylpropanoïdes est impliqué dans la production de nombreux métabolites secondaires en réponse aux stress, comme les anthocyanes, les flavones et flavonols, les acides féruliques (précurseurs de la lignine) et l'acide caféique (Hura et al., 2009). Il n'est donc pas surprenant que sa production augmente en réponse au stress hydrique.

Chapitre VI

Impact des niveaux de NAD sur la prolifération des pucerons chez *Arabidopsis thaliana*

Nous avons vu dans l'introduction ainsi que dans les chapitres précédents que le métabolisme du NAD était impliqué dans un grand nombre de réponses aux stress environnementaux, en particulier les stress abiotiques et les stress pathogènes. Cependant jusqu'ici, il n'existe presque pas de travaux montrant une implication directe du métabolisme des nucléotides à pyridine des plantes dans la réponse à une attaque de ravageur (Rawat et al., 2012). Il existe par contre quelques études récentes rapportant l'implication de cytochrome P450 NADPH-réductases dans la détoxification par les insectes de composés du métabolisme secondaire des plantes (Keeling et al., 2013 ; Liu et al., 2014 a et b ; Pottier et al., 2012). Dans le cadre de notre travail sur les conséquences physiologiques des dérégulations du niveau de NAD sur le métabolisme des plantes en réponse aux stress, nous avons donc décidé d'initier une étude sur la question de l'influence des niveaux de NAD de la plante sur le développement des ravageurs, en utilisant le puceron *Myzus persicae* comme modèle. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Juergen Kroymann & Marina Pfalz, du laboratoire d'Ecologie Systématique et Evolution de l'Université Paris-Sud.

I- Description du pathosystème *Arabidopsis thaliana* – *Myzus persicae*

Parmi le grand nombre d'insectes se nourrissant de plantes, les pucerons interagissent avec leurs hôtes dans une forme assez particulière. En effet, au lieu de retirer des quantités plus ou moins grandes de tissus végétaux, ils se nourrissent presque exclusivement de la sève du phloème. Ce style d'alimentation provoque peu de dégâts directs sur les tissus de la plante, mais à des conséquences importantes sur le métabolisme de la plante, en raréfiant ses ressources et en réduisant la production de biomasse, entraînant parfois des pertes de rendement considérables. Ainsi les infestations de pucerons ont une incidence très négative sur la plante hôte. La plupart des pucerons sont aussi vecteurs de maladies virales. Les pucerons

appartiennent à un grand groupe d'insectes hémiptères qui utilisent le stylet de leur bouche pour percer les tissus foliaires et se nourrissent dans le phloème. *Myzus persicae* (**Figure 76**), communément connu sous le nom de puceron vert du pêcher, est un ravageur de plus de 400 espèces végétales différentes appartenant à plus de 50 familles, dont un grand nombre sont des espèces d'intérêt agronomique comme la pomme de terre, la tomate, la canne à sucre, la pêche, l'amande, la cerise, les choux ou les cucurbitacées (Blackman and Eastop, 2000 ; Louis & Shah, 2013).

L'interaction compatible entre l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* et le puceron vert du pêcher est utilisée ici pour caractériser la réponse des plantes contre un ravageur se nourrissant des solutés présents dans le phloème (Louis et al 2012). Ce pathosystème est également très utilisé pour étudier la variation génétique naturelle entre les différentes accessions d'*Arabidopsis thaliana* (Carbera y poch et al., 1998). Le cycle de reproduction de *Myzus persicae* est relativement court (6-10 jours environ) et sa synchronisation en laboratoire est relativement bien contrôlée, ce qui en fait un modèle idéal à notre étude exploratoire de l'influence des teneurs en NAD sur les interactions plantes-ravageurs.



Figure 76 : Photographie d'un puceron *Myzus persicae* au stade adulte. Source : www.theaphidroom.wordpress.com

II- Les niveaux de NAD influent sur la prolifération des pucerons

Afin de tester la résistance des différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* au puceron *Myzus persicae*, nous avons effectué des tests de prolifération des pucerons sur les plantes. Les résultats montrent que les plantes aux teneurs altérées en NAD ont moins de pucerons par rapport au Ctrl 10 jours après dépôt des pucerons (environ 20% de pucerons de moins pour l'ensemble des lignées par rapport au Ctrl) (**Figure 77a**).

Afin de savoir si la taille des plantes exerce une influence sur le développement des pucerons, puisque les lignées étudiées ont une croissance différente, le diamètre des rosettes a été mesuré sur l'ensemble des plantes en début et fin d'expérience, et des tests d'analyses de variance à deux facteurs (taille de rosette vs nombre de pucerons, pour chaque génotype) ont été réalisés (données non montrées). Les résultats montrent que la croissance de la rosette n'influe pas sur la prolifération des pucerons, puisque toutes les lignées transgéniques montrent une résistance accrue aux pucerons, quelque soit la taille de la rosette et sa croissance (**Figure 77b**). Pour autant, lorsqu'on utilise des plantes témoins présentant également un retard de croissance similaire aux mutants *mAO*, comme les mutants *tdr* et *cle41* (TDR pour TDIF Receptor, Hirakawa et al., 2008 ; CLE41 pour CLV3/ESR1-LIKE 41, Ito et al., 2006), on observe aussi une moindre prolifération des pucerons (**Figure 77a**). Il n'en demeure pas moins que ces mutants développementaux, cordialement fournis par Yves Deveaux au laboratoire, sont peut-être affectés dans le développement des tissus vasculaires à partir desquels se nourrissent les pucerons.

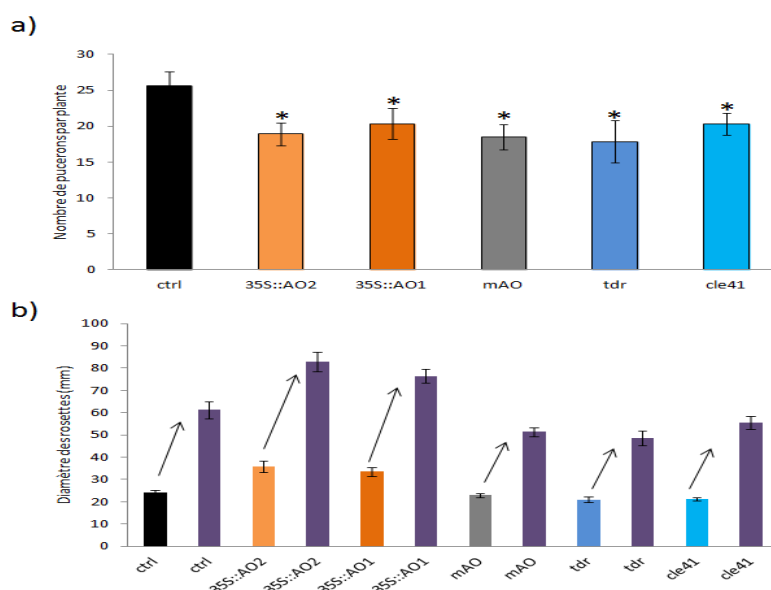


Figure 77 : Tests de prolifération des pucerons *Myzus persicae* sur les lignées d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO, 35S::AO, tdr et cle41. (tdr, pour TDIF Receptor et CLE41 pour CLV3/ESR1-LIKE 41). a) nombre de pucerons par plante 10 jours après dépôt et b) évolution de la taille des rosettes au cours du stress. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Le dépôt des pucerons est réalisé au bout de 6 semaines. Les résultats représentent les moyennes de deux expériences indépendantes sur 10 plantes par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

III- La présence de pucerons sur les plantes s'accompagne d'une modification des pools de NAD et de glutathion

Deux jours après dépôt de 15 pucerons par plante, les niveaux de NAD ont été mesurés. La multiplication des pucerons sur les plantes induit une augmentation des teneurs en NAD(H) et NADP(H) dans l'ensemble des lignées (**Figure 78a et b**). On observe aussi une tendance à l'oxydation des pools de glutathion chez les plantes Ctrl (**Figure 79**). Chez les plantes Ctrl, qui sont celles où les pucerons prolifèrent le plus, on observe, outre une légère oxydation du pool de glutathion, une augmentation des teneurs en NAD^+ et NADPH, suggérant une altération de l'état redox (en lien avec une suraccumulation de ROS ?) de ces plantes en réponse aux pucerons (**Figure 78a**). Une augmentation des teneurs en GSH et GSSG est observée chez les lignées aux teneurs en NAD modifiées, mais sans que leur état redox ne soit altéré.

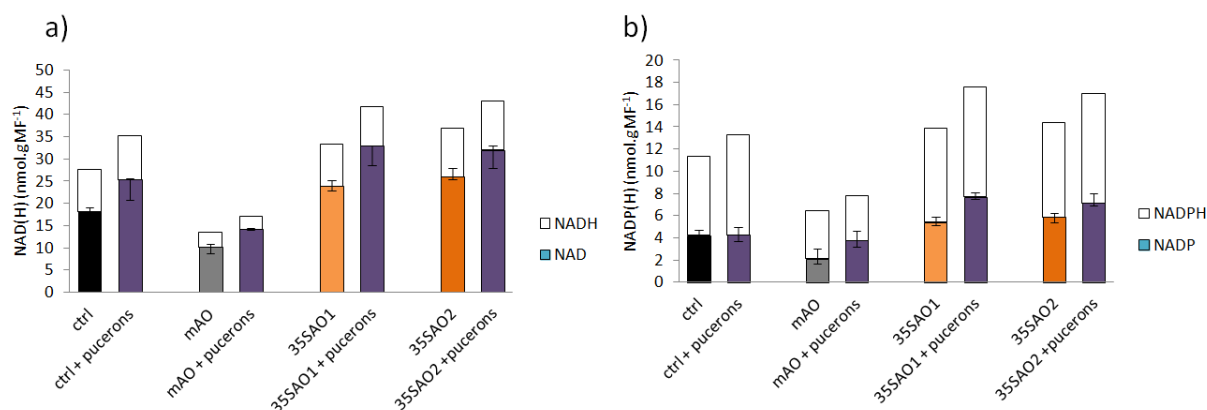


Figure 78 : Mesure des pools libres intracellulaires de nucléotides à pyridine sur les lignées d’*Arabidopsis thaliana* Ctrl, MAO et 35S::AO, en condition témoin et 2 jours après colonisation par des pucerons. a) Pool de NAD⁺ et de NADH ; b) NADP⁺ et NADPH. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100 µmoles photons m².s⁻¹. Le dépôt des pucerons sur les plantes est réalisé 6 semaines après semis. Les valeurs représentent les moyennes de trois échantillons indépendants par génotype ± l’erreur standard.

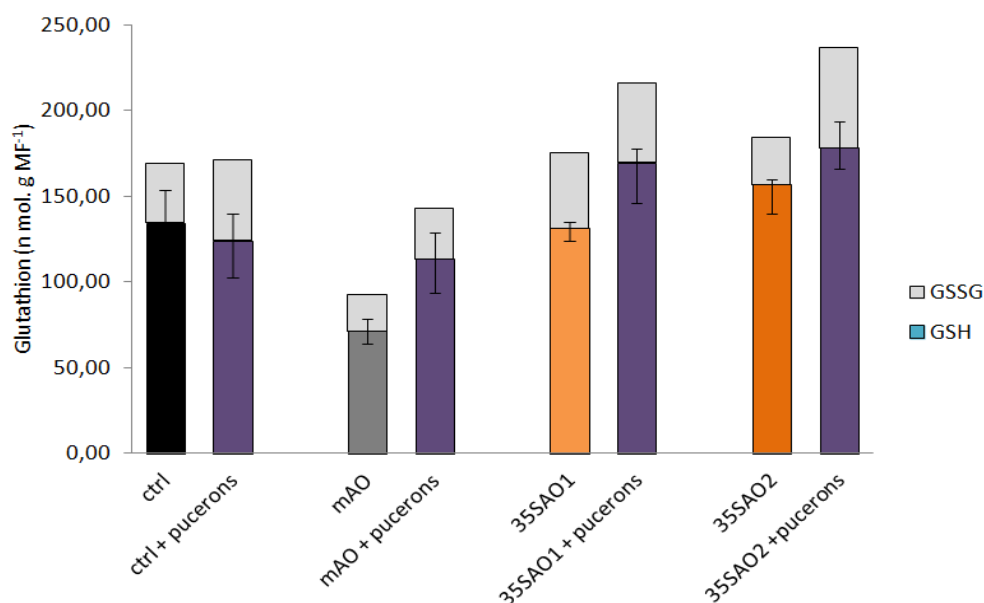


Figure 79 : Mesure des pools libres intracellulaires de glutathion sur les lignées d’*Arabidopsis thaliana* Ctrl, MAO et 35S::AO, en condition témoin et 2 jours après colonisation par des pucerons. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de 100 µmoles photons m².s⁻¹. Le dépôt des pucerons sur les plantes est réalisé 6 semaines après semis. Les valeurs représentent les moyennes de trois échantillons indépendants par génotype ± l’erreur standard.

IV- Le profil des indoles glucosinolates est altéré chez les mutants *mAO* pauvres en NAD

Les glucosinolates sont des métabolites secondaires soufrés et azotés présents chez *Arabidopsis thaliana* et l'ensemble des Brassicales. Les glucosinolates et leurs produits de dégradation serviraient de stimulant alimentaires et de ponte pour les insectes spécialistes des plantes contenant les glucosinolates, mais ils agissent surtout comme toxines ou répulsifs contre les autres insectes herbivores (Raybould and Moyes, 2001; Kliebenstein et al., 2005). Il a été depuis peu découvert que les glucosinolates jouent un rôle important dans la résistance des plantes contre les ravageurs non adaptés (Bednarek et al., 2009; Clay et al., 2009). Dans ce contexte, les indoles glucosinolates modifiés dérivés du tryptophane jouent un rôle central, notamment dans la réponse à la colonisation par des pucerons (Kim & Jander, 2007 ; Kim et al., 2008).

Les niveaux des glucosinolates produits par nos lignées d'*Arabidopsis thaliana* ont été mesurés par HPLC. Cinq glucosinolates dérivés de la méthionine (glucosinolates aliphatiques) et 4 dérivés du tryptophane (glucosinolates indoliques) ont ainsi été identifiés. De manière générale, on observe que les plantes surexprimant l'AO et les plantes Ctrl ont des profils chromatographiques très similaires. Le *mAO* présente un profil de glucosinolates très différent. En effet, une augmentation des glucosinolates aliphatiques de 50 à 100% est observée chez les lignées mutantes *mAO*, et en ce qui concerne les indoles-glucosinolates, une augmentation de 50 – 100% de 4OH-I3M et I3M est observée (**Figure 80**). De plus, le 1MO-I3M a un niveau très élevé chez *mAO* (supérieur de 300%) par rapport au Ctrl et le 4MO-I3M a un niveau diminué de 25% chez le *mAO* par rapport au Ctrl. Les niveaux très élevés de 1MO-I3M traduiraient un shift dans la voie des indol-glucosinolates au détriment du 4MO-I3M (**Figure 80**).

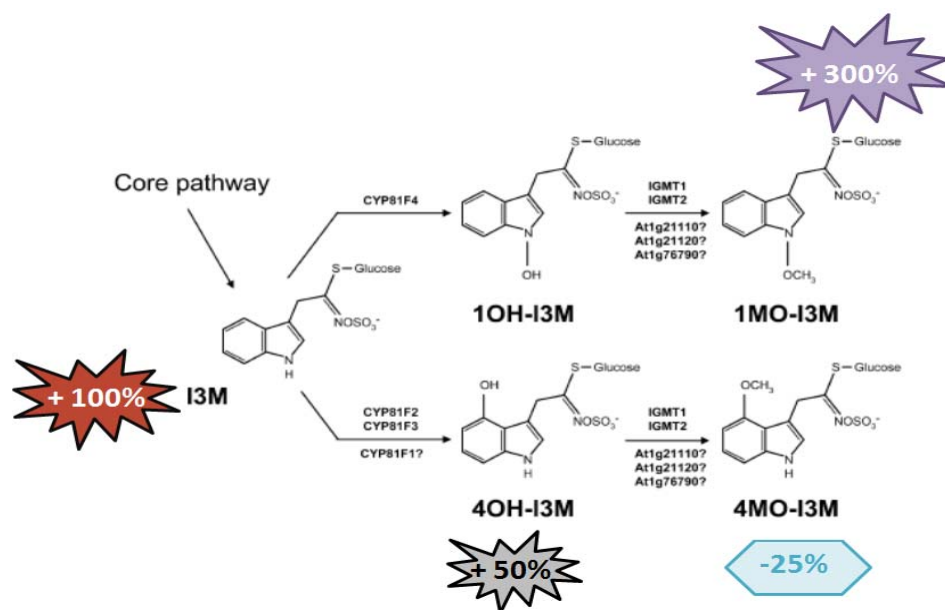


Figure 80 : Niveaux d'induction (en %) de la voie de modification des glucosinolates indoliques chez le mutant *mAO* par rapport au Ctrl mesurés par HPLC. Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Les valeurs représentent les moyennes de deux répétitions sur cinq échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard.

Chez les mutants *mAO*, la diminution des teneurs en NAD augmente la teneur en glucosinolates aliphatiques et indoliques et déséquilibre la voie de modification des glucosinolates indoliques impliqués dans la résistance à la colonisation par les pucerons. Les données issues de l'hormonome décrites dans le chapitre précédent indiquant une très forte production d'auxine dans les lignées *mAO*, il semble que la diminution des teneurs en NAD stimule la voie métabolique centrale des glucosinolates à laquelle sont associées l'IAA et la camalexine, ces trois molécules (glucosinolates indoliques, IAA et camalexine) étant dérivées de l'I3M (**Figure 80**). A l'appui de cette interprétation, les niveaux de tryptophanes (précurseur de l'I3M) sont abaissés, suggérant leur utilisation par les voies du métabolisme secondaire de ces plantes. Ces modifications pourraient expliquer la faible multiplication des pucerons sur les mutants *mAO*. A l'inverse, chez les plantes riches en NAD, les profils en glucosinolates indoliques étant similaires à ceux des plantes Ctrl, le profil de glucosinolates ne permet pas d'expliquer la plus grande résistance des plantes à la colonisation par les pucerons.

V- Les transcrits *PR1* sont fortement accumulés chez les plantes plus sensibles aux pucerons et sont constitutivement exprimés dans les plantes riches en NAD

L'expression de *PR-1* (pour « Pathogenesis Related Protein1 »), gène marqueur des réactions de défense, a été quantifiée dans l'ensemble des lignées, afin d'évaluer l'implication d'une signalisation de défense dépendante de l'acide salicylique (SA) chez nos lignées (Vlot et al., 2009). Le niveau d'expression de ce gène est très fortement induit dans les plantes Ctrl en réponse à l'infestation par les pucerons, et moins dans les autres lignées. Les lignées *35S::AO* accumulent de façon constitutive les transcrits *PR-1*, indépendamment de la présence ou non de pucerons sur les plantes (**Figure 81**). Ces résultats semblent suggérer une plus forte accumulation de SA chez les plantes Ctrl en réponse aux pucerons, mais une accumulation constitutive de SA avant inoculation des pucerons.

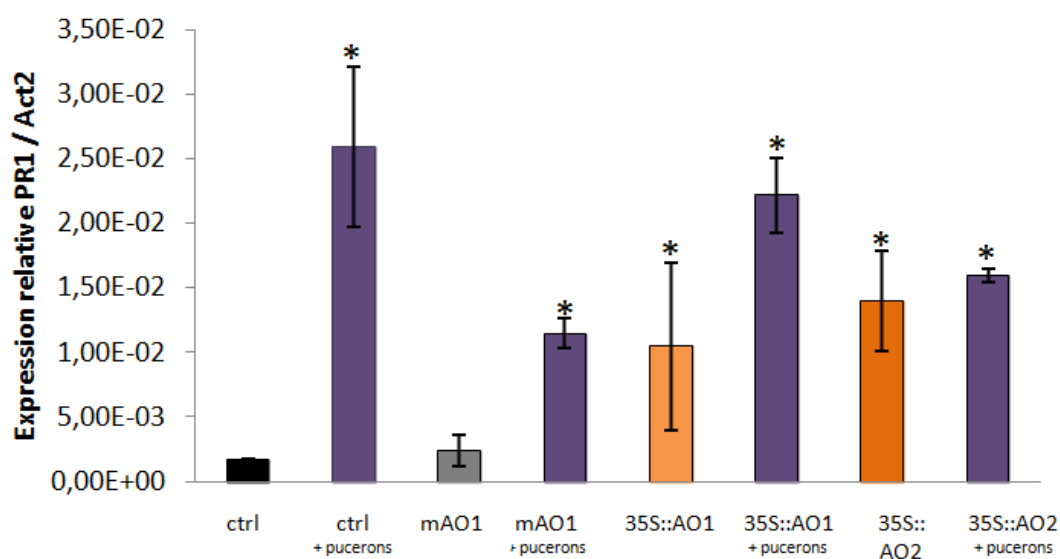


Figure 81. Analyse des niveaux de transcrits *PR1* des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1* et 2. Expression relative par rapport à l'actine 2. En conditions non infestées (histogrammes colorés) et deux jours après infestation (histogrammes violets), Les plantes ont été cultivées sur terreau pendant 6 semaines en condition jours courts (photopériode 8h) à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{moles photons m}^2.\text{s}^{-1}$. Le dépôt des pucerons sur les plantes est réalisé 6 semaines après semis. Les valeurs représentent les moyennes de quatre échantillons indépendants par génotype \pm l'erreur standard. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

VI- Discussion

Le travail engagé dans cette étude est un travail exploratoire permettant d'évaluer l'implication des teneurs en NAD dans la résistance des plantes aux ravageurs. Comme nous l'avons vu en introduction, le NAD est impliqué dans les réponses aux stress environnementaux. Au laboratoire, nous avons mis en évidence le rôle d'une accumulation du NAD dans la résistance des plantes d'*Arabidopsis thaliana* à la bactérie phytopathogène *Pst* par induction de la voie de l'acide salicylique (Pétriacq et al., 2012 ; ce travail, chapitre VII). Cependant, très peu de données sont disponibles quant à l'implication des niveaux de NAD dans la résistance aux ravageurs de type insectes. Nous avons donc cherché à savoir si des modifications des niveaux de NAD pouvaient entraîner un ralentissement de la colonisation de pucerons chez les Brassicacées, en l'occurrence chez *Arabidopsis thaliana*, et si cette résistance serait liée à une signalisation dépendante de l'acide salicylique. Dans le cas d'*Arabidopsis thaliana*, la résistance aux pucerons est aussi liée à la production de glucosinolates par les plantes. Or il n'existe aucune donnée reliant les niveaux de NAD et la biosynthèse des glucosinolates.

Les Brassicales disposent d'un arsenal de défense spécifique pour faire face aux ravageurs, les glucosinolates. En effet, les données de la littérature montrent que lorsqu'une plante accumule des glucosinolates indoliques, celle-ci est moins colonisée par les pucerons (Kim et al., 2008). Nous pensions que les mutants *mAO*, produisant moins de NAD, seraient plus facilement colonisés par les pucerons. Or, il n'en est rien. La meilleure résistance de ces lignées aux pucerons peut s'expliquer par une plus forte stimulation de la voie centrale des glucosinolates indoliques qui conduit à une accumulation de certains glucosinolates, mais aussi de l'IAA. Cette résistance peut aussi s'expliquer par un déséquilibre des voies de synthèse des composés indoliques, conduisant à des modifications des niveaux d'I3M et de 4MOI3M. A l'appui de cette hypothèse, les données de la littérature suggèrent que les produits de dégradation de l'I3M, lequel s'accumule dans les plantes mutantes *mAO*, ont des propriétés répulsives (Kim et al., 2008).

On pourrait encore imaginer que l'altération des niveaux de NAD ou de précurseurs d'acides aminés dans les plantes transgéniques peut également avoir des répercussions sur l'apport nutritionnel aux pucerons, ralentissant ou accélérant leur multiplication. Par exemple, le symbiote du puceron, *Buchnera aphidicola*, utilise la glutamine et des précurseurs d'acides aminés issus du phloème, pour synthétiser des acides aminés tels que la leucine et la méthionine que les pucerons ne peuvent synthétiser eux-même (Ramsey et al., 2010 ; Macdonald et al., 2012 ; Sandstrom & Moran, 1999).

Nous nous attendions à ce que la multiplication des pucerons sur des plantes riches en NAD soit ralentie, puisque des niveaux élevés de NAD sont habituellement associés à une meilleure résistance aux stress biotiques. Nos résultats ont confirmé notre postulat sans nous avoir donné une explication complète, puisque les niveaux en glucosinolates sont comparables aux plantes Ctrl. Cependant, l'induction constitutive de l'expression du gène *PR1* laisse penser que les défenses sont exacerbées dans les lignées 35S::AO, riches en NAD, ce qui signerait une stimulation des défenses dépendantes notamment de l'acide salicylique. Si l'implication de la voie de l'acide salicylique dans la résistance des plantes de blé à la colonisation par les pucerons n'est pas exclue (Mohase & Westhuizen 2002), il semblerait que, chez que *Arabidopsis thaliana*, les teneurs en SA ne soient pas corrélées à la résistance des plantes aux pucerons. Cette résistance serait probablement dépendante d'une combinaison de signaux, notamment l'acide jasmonique et les ROS qui joueraient un rôle prépondérant dans la résistance aux pucerons (De Vos & Jander, 2009 ; Lei et al., 2014). Il est possible que les fortes teneurs en NAD maintiennent une production de ROS basale n'affectant pas l'état rédox global de la plante, mais qui serait suffisante pour conditionner des défenses basales s'opposant à la multiplication des pucerons. A l'appui de cette hypothèse, des variétés de blé et de riz résistantes ont des activités NADPH-oxydases plus fortes que celles de variétés sensibles en réponse à la présence de pucerons et aux cécidomyies (Moloi & Westhuizen 2006 ; Rawat et al., 2012).

Chapitre VII

Rôle de l'aspartate oxydase dans la résistance d'*Arabidopsis thaliana* à des microorganismes pathogènes

Dans la nature, la croissance et le développement des plantes sont influencés par de nombreux facteurs de stress abiotiques ou biotiques. Les stress biotiques résultent de l'action préjudiciable d'organismes, tels que les bactéries, champignons ou insectes. En effet, les plantes vivent au contact d'organismes et microorganismes variés pouvant être potentiellement parasites et pathogènes. Cependant, l'issue de ce type d'interaction est rarement la maladie car, dans la plupart des cas, ces organismes sont incapables de se développer sur les plantes, soit parce qu'ils n'ont pas les 'armes' adaptées pour les attaquer, soit parce que les plantes ont mis en place des moyens de défense adaptés et efficaces contre ces organismes (Holub *et al.*, 2001). L'issue de l'interaction est alors conditionnée par le pouvoir pathogène de l'agresseur et la capacité de la plante à résister.

I- Rôle de l'aspartate oxydase dans la résistance d'*Arabidopsis thaliana* à des microorganismes pathogènes

A- Présentation des principaux concepts et termes employés dans cette étude

Il existe chez les plantes deux grandes lignes de défense contre les microorganismes pathogènes : des défenses passives et constitutives, et des défenses actives et induites. Pour infecter une plante, l'agent pathogène doit tout d'abord se confronter à des barrières physiques (cuticule, paroi) et chimiques (ex : des métabolites secondaires antimicrobiens). Cette première ligne de défense constitue les défenses passives et préformées, car pré-existantes dans la plante avant toute attaque. L'entrée des agents pathogènes, comme par exemple des bactéries *Pst*, se fait donc généralement au niveau des orifices naturels (ex : stomates) ou des blessures de la plante. Ces barrières préformées ne suffisent pas toujours à empêcher la pénétration et le développement des agents pathogènes. C'est pourquoi les plantes ont mis en place au cours de leur évolution des systèmes de défense actifs, induits par la perception de ces microorganismes et déclenchant

des événements en cascades conduisant à la mise en place de défenses plus efficaces.

Lorsque l'ensemble des variétés (ou cultivars ou écotypes) d'une espèce végétale est résistant à n'importe quel isolat d'un microorganisme, on dit que ce végétal présente une résistance de type non-hôte à ce microorganisme. Si au contraire certains isolats d'un agent pathogène sont capables d'infecter certaines variétés d'une espèce végétale, on parlera de résistance hôte. Dans le cas où l'agent pathogène arrive à se développer dans la plante et entraîne la maladie, l'interaction est qualifiée de compatible : le microorganisme pathogène est dit virulent et la plante, sensible. Au contraire, lorsqu'il y a reconnaissance de l'agent pathogène et que ce dernier ne parvient pas à se développer dans les tissus de la plante, il est dit avirulent et la plante, résistante (Jones & Dangl, 2006).

La perception des microorganismes par les plantes peut se produire à deux niveaux et induire deux types d'immunité. Dans un premier temps, des éléments structuraux communs à de nombreuses espèces de microorganismes et appelés MAMPs ou PAMPs (*Microbe/Pathogen-Associated Molecular Patterns*) peuvent être reconnus au niveau de récepteurs, les PRR (*Plant pattern Recognition Receptor*), généralement présents au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales (Monaghan & Zipfel, 2012). Cette reconnaissance, peu spécifique, conduit à la mise en place d'une résistance nommée PTI (*PAMP-Triggered Immunity*), intervenant dans les phénomènes de résistance basale. La résistance basale a été définie par Jones et Dangl (2006) comme une résistance de nature quantitative, polygénique, qui permet à la plante de limiter l'étendue de la maladie, mais qui est insuffisamment efficace pour arrêter le développement et la propagation de l'agent pathogène. La littérature plus récente a tendance à restreindre la résistance basale à la PTI. Dans un second temps, certains agents pathogènes ont évolué pour contourner cette résistance basale, grâce à l'acquisition de nouveaux gènes codant pour des protéines effectrices de virulence (ou effecteurs), qui sont délivrées dans les cellules hôtes, conduisant à une sensibilité accrue de la plante et à la mise en place de la maladie (Jones & Dangl, 2006). Au cours de leur évolution, certaines plantes ont développé des mécanismes de reconnaissance spécifique de ces effecteurs par des récepteurs, généralement intracellulaires, et appelées protéines de résistance (ou

protéines R, codées par les gènes *R*). Les bases de cette interaction moléculaire reposent sur le concept que les produits de gènes de résistance (*R*) de la plante reconnaissent, de façon très spécifique, les effecteurs, dans ce cas appelés produits de gènes d'avirulence (*Avr*) de l'agent pathogène (Hammond-Kosack & Parker, 2003). L'interaction directe R-Avr a été démontrée dans quelques cas. Dans d'autres cas, cette reconnaissance est indirecte et répond au modèle de garde (Dangl & Jones, 2001). D'après ce modèle, dans les cellules hôtes les protéines R gardent au sens de surveiller, l'intégrité de cibles visées par les protéines Avr des agents pathogènes. La détection d'une interaction d'un facteur d'avirulence avec la cible provoquerait l'activation de la protéine R et la résistance. Cette reconnaissance conduit à la mise en place rapide d'une résistance appelée ETI (*Effector-Triggered Immunity*), correspondant au déclenchement de cascades de signalisation conduisant à la mise en place d'une réaction d'hypersensibilité (HR), souvent associée à la mort programmée des cellules végétales attaquées, et à la restriction des agents pathogènes au site d'attaque (Mur et al., 2008). Cette résistance de type ETI est particulièrement efficace contre les agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes (termes définis dans le paragraphe A.2) (Glazebrook, 2005). La PTI et l'ETI partagent des événements communs de signalisation comme la production de formes activées de l'oxygène, des flux ioniques, la synthèse accrue de phytohormones telles que l'acide salicylique (SA) ou l'acide jasmonique (JA) et l'accumulation de protéines antimicrobiennes (les protéines PR ou *Pathogenesis-Related Proteins*) ou de métabolites secondaires antimicrobiens (les phytoalexines) (Schwessinger & Zipfel, 2008). Il est considéré que l'ETI serait une variante plus forte de la PTI, avec des défenses d'intensité plus forte, qui se mettent en place plus rapidement et perdurent plus longtemps dans la plante, au site d'attaque mais également à distance dans la plante (Thomma et al., 2011).

B- Eléments préliminaires quant à un rôle pour l'AO dans la résistance d'Arabidopsis aux agents pathogènes et objectifs de ce travail

Un des objectifs du travail de thèse était de comprendre les conséquences d'une modulation des niveaux de NAD sur la physiologie des plantes en conditions de stress biotique. Une analyse des banques de données de transcriptomiques disponibles pour *Arabidopsis thaliana* nous a permis de mettre en évidence une forte

régulation de l'expression du gène *AO* en réponse à des stress biotiques (**Figure 82**). L'expression de l'*AO* est fortement induite en réponse à différents types de microorganismes pathogènes, comme des bactéries (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*), des champignons (*Sclerotinia sclerotium*, *Golovinomyces orontii*, *Golovinomyces cichoracearum*, *Blumeria graminis*, *Alternaria brassicicola*) ou un oomycète (*Hyaloperonospora arabidopsidis*). Ces microorganismes présentent différentes stratégies de parasitisme (biotrophie, nécrotrophie, hémibiotrophie), ce qui pourrait suggérer un rôle général de l'*AO* dans les mécanismes de défenses vis-à-vis des pathogènes. L'expression de l'*AO* est par exemple fortement induite en réponse au champignon nécrotrophe *S. sclerotium* (parasite dont l'installation sur son hôte nécessite la mort précoce des cellules attaquées ; les tissus nécrosés servant de source nutritive au champignon) ou au champignon biotrophe *G. orontii* (parasite qui s'installe sur son hôte vivant, se développe à ses dépens, sans entraîner sa mort à court terme) ou à la bactérie hémibiotrophe *P. syringae* (parasite alternant une phase biotrophe et une phase nécrotrophe au cours de son cycle parasitaire). Il faut souligner que l'*AO* est fortement régulé par ces stress biotiques, plus que tout autre gène de la voie de biosynthèse *de novo* ou de recyclage du NAD, ou de gènes impliqués dans l'utilisation du NAD (**Figure 82**). Cette observation renforce l'idée d'un rôle central de l'*AO* comme point de régulation transcriptionnelle pour l'accumulation du NAD, notamment en réponse aux agents pathogènes.

Des données récentes de la littérature ont mis en évidence un rôle pour l'*AO* et le NAD dans la résistance d'*Arabidopsis thaliana* à différentes souches de la bactérie gram-négative *Pseudomonas syringae* (Zhang & Mou, 2009; Macho et al., 2012; Pétriacq et al., 2012; Zhang & Mou, 2012). Afin de compléter ces travaux, nous avons entrepris l'étude des deux lignées indépendantes d'insertion ADN-T dans l'*AO* *mAO1* et *mAO2* et de deux lignées indépendantes surexprimant l'*AO* *35S::AO1* et *35S::AO2* chez *Arabidopsis thaliana*, dans un contexte d'interactions avec la bactérie modèle *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, souche DC3000, abrégée *Pst* dans la suite du texte. Chez l'écotype Col-0 d'*Arabidopsis thaliana*, l'expression de l'*AO* est fortement induite dans les feuilles après inoculation de la bactérie *Pst* virulente et de la bactérie avirulente *Pst-AvrRpm1* (**Figure 82** et Pétriacq et al., 2012). La bactérie *Pst-AvrRpm1* correspond à la bactérie *Pst* exprimant le gène d'avirulence *AvrRpm1*,

dont le produit est reconnu par la protéine de résistance RPM1 et qui déclenche une ETI chez l'écotype Col-0 d'*Arabidopsis thaliana* (Glazebrook & Ausubel, 1994). Ces deux souches étant disponibles au laboratoire, nous avons choisi d'étudier leurs interactions avec les lignées d'*Arabidopsis thaliana*. Elles seront nommées respectivement *Pst* (bactérie virulente) et *Pst-AvrRpm1* (bactérie avirulente) dans la suite de ce travail. Afin de tester un rôle plus large de l'AO et du NAD dans les défenses à différents types d'agents pathogènes, la résistance de ces lignées a également été testée vis-à-vis d'un champignon nécrotrophe, *Botrytis cinerea*, disponible au laboratoire.

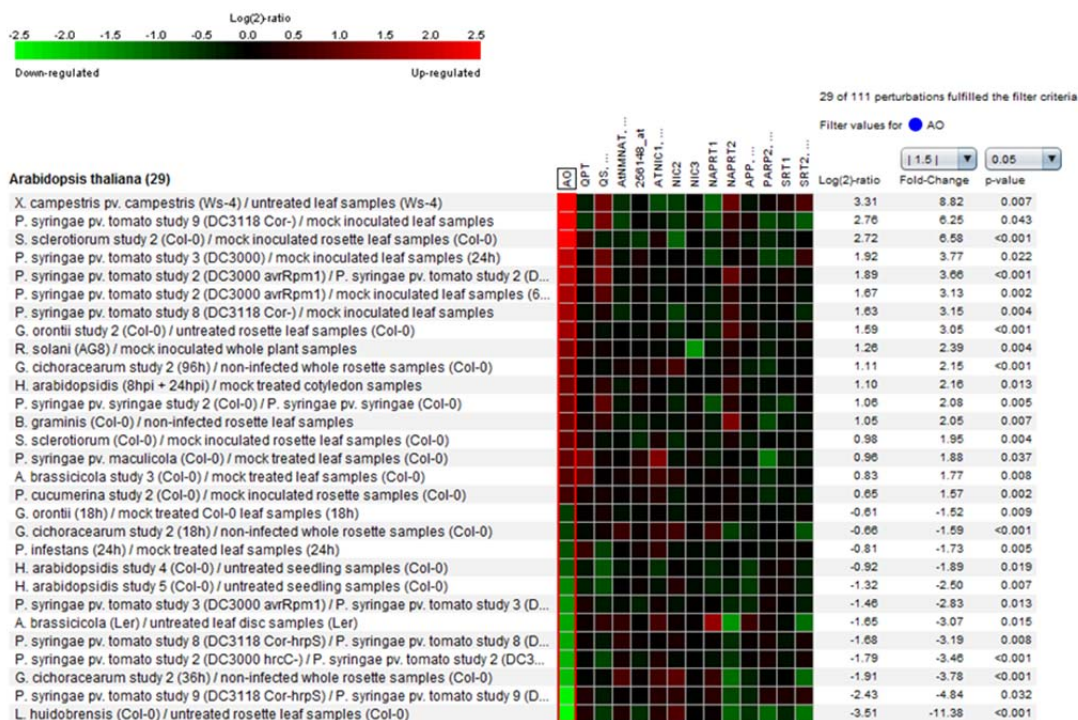


Figure 82 : Résumé des données d'expression de différents gènes du métabolisme du NAD, obtenues à l'aide de l'interface Genevestigator (www.genevestigator.com/gv/). Les données sélectionnées correspondent à des traitements biotiques (set 'biotic') appliqués sur des écotypes sauvages d'*Arabidopsis*. Seules les données avec un facteur d'induction/répression supérieur à 1,51 (et p-value inférieure à 0,05) ont été conservées.

A gauche : liste des agents pathogènes appliqués (*Xanthomonas campestris pv. campestris*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pseudomonas syringae pv. tomato*, *Golovinomyces orontii*, *Ralstonia solanacearum*, *Blumeria graminis*, *Alternaria brassicicola*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Golovinomyces cichoracearum*, *Hyaloperonospora arabidopsidis*, *Liriomyza huidobrensis*).

En haut au centre : liste des gènes analysés. De gauche à droite : aspartate oxydase, quinolinate phosphoribosyltransferase, quinolinate synthase, acide nicotinique mononucléotide adényltransférase, quinolinate synthase, nicotinamiase 1, 2 et 3, nicotinate phosphoribosyltransférase 1 et 2, PAR polymérase 1 et 2, Sirtuine 1 et 2).

C- L'AO est impliquée dans la résistance à *Pst* mais pas à *Pst-AvrRpm1*

Le niveau de résistance des lignées *mAO1*, *mAO2*, *35S::AO1*, *35S::AO2* et contrôle (*Ctrl*) vis-à-vis de *Pst* et *Pst-AvrRpm1* a été estimé par dénombrement de la population bactérienne à différents temps après infiltration des bactéries dans le mésophylle foliaire de plantes au stade rosette (âgées de 6 semaines). La population bactérienne a été exprimée en \log_{10} cfu par cm^2 de feuille (**Figure 83**).

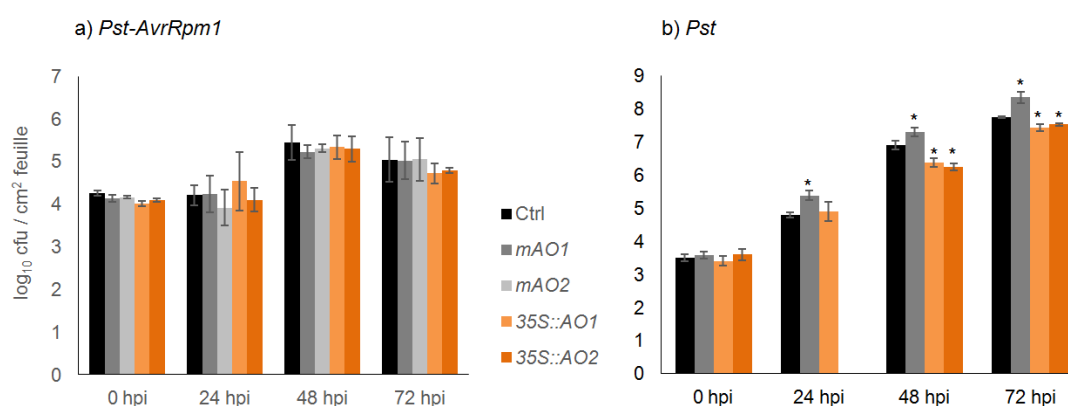


Figure 83 : Tests de résistance aux bactéries *Pst-AvrRpm1* (a) et *Pst* (b) après infiltration dans les feuilles des lignées *Ctrl*, *mAO* et *35S::AO*. La croissance bactérienne a été quantifiée à 0, 24, 48 et 72 h post-infiltration (hpi) de 10^5 cfu/mL dans les tissus foliaires d'*Arabidopsis thaliana*. a) les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes et cinq échantillons biologiques et six réplicats techniques analysés par génotype et temps \pm l'écart type. b) les résultats représentent la moyenne des deux expériences indépendantes et cinq échantillons et six réplicats techniques (pour chaque expérience), par génotype et par temps \pm l'écart type. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les *Ctrl* et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

Une faible croissance de la population de bactéries avirulentes *Pst-AvrRpm1* (un \log_{10}) a été observée entre 0 et 48 h post-inoculation (hpi) dans les lignées *Ctrl* (**Figure 83a**). La population se stabilise ensuite jusqu'à 72 h, signe que la plante contrôle le développement bactérien. A contrario, lorsque la bactérie virulente *Pst* est infiltrée, une augmentation constante du nombre de bactéries a été observée, avec une population passant de 3,5 \log_{10} à 7,7 \log_{10} en 72 h (**Figure 83b**). La croissance des bactéries *Pst-AvrRpm1* dans les feuilles des lignées *mAO* et *35S::AO* a été

identique à celle des plantes Ctrl, indiquant que ces lignées ne sont pas affectées dans leur résistance à cette bactérie (**Figure 83a**). Les mutants *mAO1* se sont révélés plus sensibles à la bactérie *Pst*, car dès 24 hpi il y avait environ 10 fois plus de bactéries dans leurs feuilles par rapport aux feuilles des plantes Ctrl. Les surexprimeurs présentaient une sensibilité plus faible par rapport aux Ctrl, avec une diminution de 3 à 5 fois de la population bactérienne aux temps 48 et 72 hpi (**Figure 83b**). Ces résultats indiquent donc que l'AO et le NAD ne sont pas impliqués dans la résistance spécifique (ETI) à *Pst-AvrRpm1*, mais participent à la résistance basale observée lorsqu'on inocule *Pst*.

D- Rôle de l'AO dans la résistance à *Pst* au niveau de la barrière épidermique

En conditions naturelles, *Pst* peut croître à la surface des feuilles de son hôte, avant de pénétrer par les orifices naturels, comme les stomates, ou par les blessures, et se multiplier dans l'apoplaste (Katagiri et al., 2002). Les plantes peuvent tenter de résister à cette invasion en fermant leurs stomates. Les cellules de garde des stomates sont en effet capables de percevoir les bactéries à la surface des feuilles (via leurs MAMPs, tels que la flagelline), ce qui déclenche des cascades de signalisation conduisant à une réponse de type PTI et à la fermeture des stomates (Zeng et al., 2010). Pour contrecarrer cette fermeture, *Pst* sécrète des facteurs de virulence et des toxines (comme la coronatine) dans les cellules de garde pour induire la réouverture des stomates. En 2012, Macho et al. ont montré que deux lignées indépendantes d'*Arabidopsis*, appelées *fin4-1* et *fin4-3*, mutées par insertion ADN-T dans le gène AO, sont affectées dans leur capacité à fermer leurs stomates en réponse à *Pst*. Il faut signaler que la lignée *fin4-3* correspond à notre lignée *mAO1* et que notre lignée *mAO2* (appelée *fin4-2* par les auteurs) n'a pas été analysée dans leur étude. *Fin4-1* correspond à une lignée dans laquelle l'ADN-T est inséré dans la région promotrice du gène AO (lignée non étudiée dans mon travail). Plus particulièrement, les auteurs ont montré que les lignées *fin4-1* et *fin4-3* ne sont plus capables de fermer leurs stomates en réponse à l'application exogène de MAMPs bactériens tels que la flagelline (Flg22) ou le facteur d'élongation elf18, ou en réponse à l'application exogène (par pulvérisation de la surface foliaire) de bactéries *Pst* COR⁻ (bactéries ne produisant plus de coronatine). Les bactéries *Pst* COR⁻ ne sont alors plus capables de pénétrer dans le mésophylle via les stomates et

les plantes présentent donc une résistance accrue à ces bactéries. Les lignées *fin* se sont cependant montrées plus sensibles à l'application par pulvérisation à la surface foliaire des bactéries *Pst COR*. Ces résultats suggèrent un rôle pour l'AO dans la réponse de type PTI et la fermeture initiale des stomates suite à la perception des MAMPS. Une moindre teneur en NAD affaiblirait la capacité de la plante à fermer ses stomates en réponse à *Pst*, ce qui pourrait rendre la plante plus sensible à l'invasion bactérienne. Nous avons voulu tester le niveau de résistance des mutants *mAO* et des surexprimeurs après pulvérisation de *Pst* (à 10^8 cfu/mL) à la surface des feuilles et analyser également la réponse des stomates après ce traitement. Les bactéries ont été pulvérisées à la surface des feuilles puis leur multiplication quantifiée dans les tissus après 48, 72 et 96 h (**Figure 84a**). Le choix des temps s'est basé sur les données de la littérature, qui montrent qu'il faut un certain laps de temps pour que les bactéries pénètrent et se multiplient dans les feuilles (Katagiri et al., 2002 ; Melotto et al., 2006). Le but étant de quantifier le nombre de bactéries ayant été capables de pénétrer et se multiplier dans le mésophylle, nous avons pris soin de laver les disques foliaires avant de les broyer, afin d'éliminer les bactéries qui auraient pu survivre et se multiplier à la surface des feuilles.

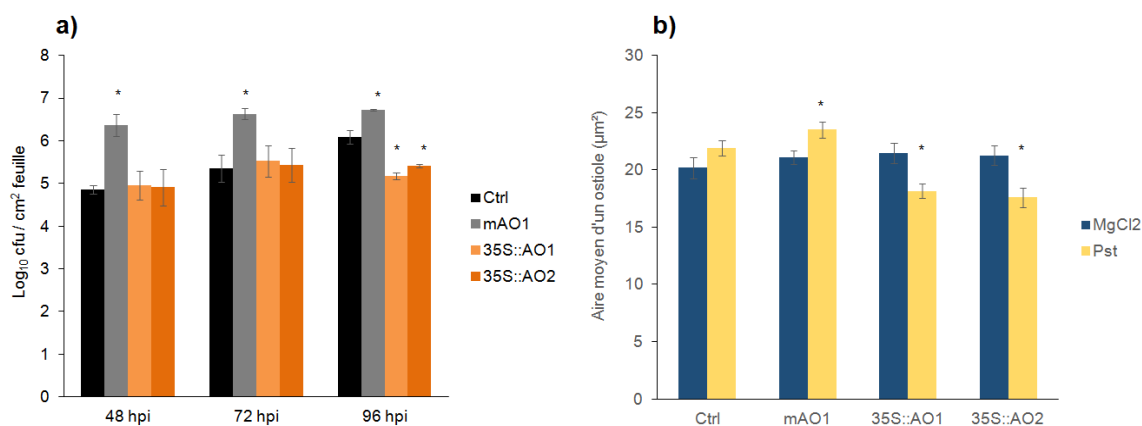


Figure 84 : Tests de résistance à *Pst* après pulvérisation sur les rosettes des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1* et 2. a) La croissance bactérienne dans les tissus foliaires a été quantifiée à 48, 72 et 96 h après pulvérisation d'une suspension bactérienne à 10^8 cfu/mL à la surface des tissus foliaires d'*Arabidopsis thaliana*. Les résultats représentent la moyenne de cinq échantillons et six réplicats techniques, par génotype et par temps \pm l'écart type. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student. Ce résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes. **b)** Mesure de l'aire moyenne d'un ostiole de l'épiderme foliaire supérieur. Les stomates de la face supérieure des feuilles ont été observés en microscopie optique 2h après pulvérisation de MgCl₂ 10mM (traitement témoin) ou de *Pst* à 10^8 cfu/mL puis l'aire des ostioles a été calculée. Les résultats représentent la moyenne des

mesures faites sur cent stomates (de 3 feuilles de 3 plantes différentes) par lignée par condition. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre chaque lignée comparée au Ctrl et à la condition $MgCl_2$ à $P < 0,05$ pour le test t de Student.

Chez les plantes *Ctrl*, la population bactérienne a été multipliée par 10 entre 48 et 96 hpi. Le mutant *mAO1* présente une croissance bactérienne plus importante que le *Ctrl* d'environ 5 à 10 fois dès 48 h et jusqu'à 96 hpi. Les lignées surexpresseurs présentent une charge bactérienne moins élevée que chez le *Ctrl* (d'environ 10 fois) mais uniquement au temps tardif de 96 h.

Nous avons ensuite voulu vérifier si la sensibilité accrue du mutant *mAO1* et la résistance plus importante des surexpresseurs à *Pst* pouvaient être liées à une modification du degré d'ouverture des stomates. Pour cela, les feuilles ont été pulvérisées comme précédemment puis leur surface observée à un temps très précoce (2 hpi). En effet, Melotto et al. (2006) ont mis en évidence une fermeture des stomates dès 1h après pulvérisation de *Pst* sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (dans des conditions similaires aux nôtres) puis une réouverture à partir de 3 hpi. Pour cette expérience préliminaire, nous avons choisi de nous placer au temps 2 h. Les feuilles ont été prélevées et leur face supérieure collée contre du ruban adhésif transparent. Le montage a ensuite été placé dans du tampon MES et les différentes épaisseurs de la feuille (épiderme inférieur, mésophylle) éliminées par raclage à l'aide d'une lame en verre. L'épiderme supérieur restant sur le ruban a ensuite été observé au microscope photonique et photographié rapidement. L'aire des ostioles a été calculée à partir de la largeur et la longueur des ostioles mesurées sur les photographies, à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ. Chez les plantes *Ctrl*, les stomates ont tendance à être légèrement plus ouverts en réponse à *Pst* par rapport au traitement témoin $MgCl_2$ (**Figure 84b**). Cette tendance n'est cependant pas statistiquement significative. Le temps d'analyse choisi, 2 h, était peut-être trop tardif ou trop précoce pour observer une ouverture/fermeture des stomates. Par contre, les stomates du mutant *mAO1* sont légèrement mais significativement plus ouverts de 7% par rapport au Ctrl et au traitement $MgCl_2$, tandis que ceux des lignées surexpresseurs sont plus fermés (de 18%). L'ensemble de ces résultats semble indiquer une plus grande sensibilité des mutants *mAO1* (pauvres en NAD), et une plus grande résistance des lignées surexpresseurs (riches en NAD) à *Pst*, qui pourrait s'expliquer au temps 2 hpi, par une ouverture plus importante des stomates

chez les mutants et au contraire une fermeture plus importante chez les surexprimeurs. Une modulation de l'ouverture des stomates contrôlée par les niveaux d'AO accélérerait ou au contraire ralentirait ainsi la pénétration et multiplication des bactéries dans le mésophylle. Le résultat obtenu chez les surexprimeurs doit cependant prendre en compte le fait que la moindre multiplication des bactéries dans le mésophylle observée est tardive et pourrait s'expliquer par une plus forte résistance au niveau des cellules du mésophylle (**Figure 83b**). Dans ce contexte, il est possible que la fermeture plus importante des stomates, observée à 2 h chez les surexprimeurs, n'ait pas significativement limité la pénétration des bactéries dans le mésophylle. Chez *mAO1*, la plus forte sensibilité est au contraire observée plus précocement (dès 48 h), ce qui tend à suggérer que la moindre fermeture des stomates peut avoir favorisé l'invasion des bactéries.

Dans les expériences suivantes, nous nous sommes placés dans des conditions d'inoculation de *Pst* par infiltration, afin d'analyser les réponses moléculaires et métaboliques des différentes lignées à *Pst*.

E- L'expression de l'AO est induite en réponse à Pst

L'expression de l'AO a été étudiée par RT-qPCR à différents temps après inoculation de *Pst* dans les tissus foliaires des plantes Ctrl et des lignées *mAO* et *35S::AO*.

Conformément aux données de transcriptomique présentées précédemment, l'inoculation de *Pst* induit une forte accumulation des transcrits AO dans des plantes contrôles (**Figure 85**). Cette accumulation est observée dès 8h et maximale à 24 hpi, avec 50 fois plus de transcrits accumulés par rapport au traitement $MgCl_2$. Chez les mutants *mAO1* et *mAO2*, une accumulation plus réduite et retardée des transcrits a été observée : les transcrits ne commencent à s'accumuler significativement par rapport au $MgCl_2$ qu'à partir de 24 h, et à des niveaux plus faibles par rapport au Ctrl. Le contraire est observé chez les lignées surexprimeurs : accumulation précoce et à des niveaux beaucoup plus élevés que chez les plantes Ctrl (en moyenne 6 fois plus de transcrits à 8 h et 48 h). Ces résultats indiquent donc qu'il y a une régulation transcriptionnelle du gène AO muté (chez *mAO*) ou du gène AO endogène

(surexpresseurs) mais que ces lignées sont affectées dans la cinétique et l'amplitude d'expression du gène.

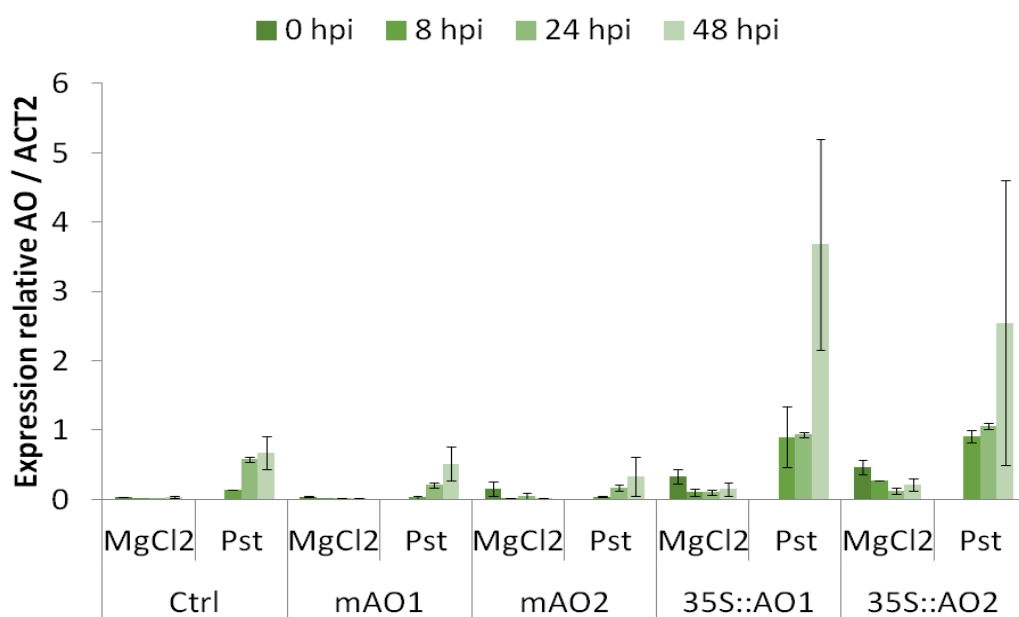


Figure 85 : Analyse par RT-qPCR de l'expression du gène *AO* après inoculation de *Pst* sur les plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées *Ctrl*, *mAO* et *35S::AO*. Les plantes ont été inoculées par infiltration de *Pst* (10^7 cfu.mL⁻¹) ou de MgCl₂ (10 mM) dans les tissus foliaires des plantes contrôle (*Ctrl*), et des lignées *mAO* et *35S::AO*. Les niveaux de transcrits sont exprimés en expression relative par rapport aux niveaux de transcrits du gène de référence *ACT2*. Les résultats représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants (et deux réplicatas techniques par échantillon) \pm l'erreur standard et sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

F- Les niveaux de NAD/P(H) varient en réponse à *Pst*

Les niveaux de NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH ont été analysés dans les différentes lignées après inoculation de *Pst* (ou de MgCl₂ comme traitement témoin) dans les feuilles des différentes lignées. Aux temps 0 (prélèvement le matin, 2h après illumination des plantes), les niveaux de NAD⁺ et NADH sont réduits chez le mutant *mAO1*, *mAO2* (mais dans une moindre mesure par rapport à *mAO1*), et augmentés chez les deux surexpresseurs (**Figure 86**). Après 8h de lumière supplémentaire (et de traitement MgCl₂), les niveaux sont augmentés dans toutes les lignées, sauf les surexpresseurs chez qui un maximum d'accumulation semble être atteint dès le matin. Après 24 h de traitement MgCl₂, les niveaux sont revenus au niveau basal du temps 0. Ces observations sont similaires pour les teneurs en

NADP⁺ et NADPH aux temps 0 h et 8 h. A 24 h, les niveaux en NADP(H) sont inférieurs à ceux observés aux temps 0 (Figure 86).

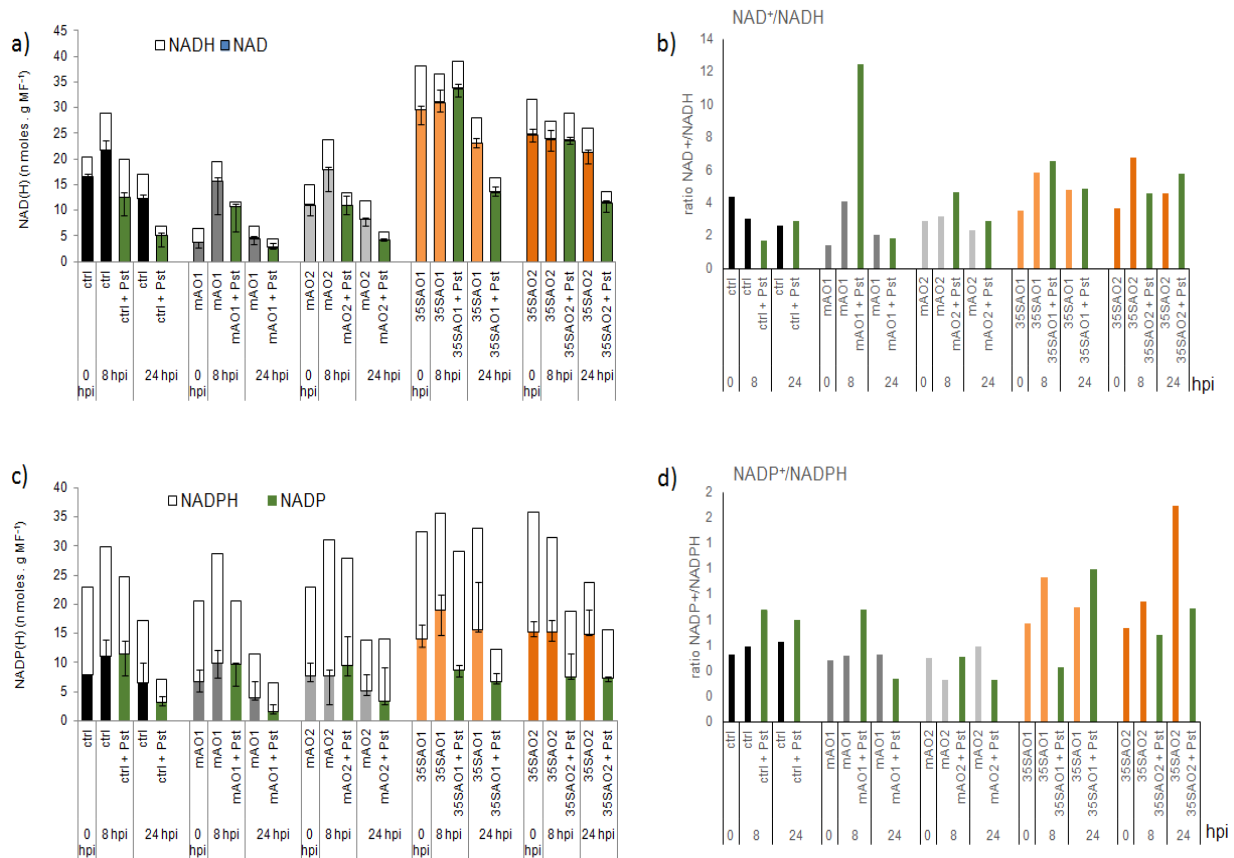


Figure 86 : Evolution des teneurs en NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH et des ratios NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH après inoculation de *Pst* sur les plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1* et 2. Les plantes ont été inoculées par infiltration de *Pst* (10⁷ cfu.mL⁻¹) ou de MgCl₂ (10 mM) dans les tissus foliaires. Les niveaux de NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH ont été dosés par spectrophotométrie aux temps 0 h (correspond à des feuilles infiltrées avec du MgCl₂ et immédiatement prélevées), 8 et 24 h après inoculation de *Pst* (indiqués + Pst sur la figure) ou de MgCl₂ (correspond aux échantillons ctrl, *mAO1*, *mAO2*, *35S::AO1*, *35S::AO2* sur la figure) et exprimés en nmoles par g de matière fraîche. Le ratio NAD⁺/NADPH et NADP⁺/NADPH a été calculé pour chaque condition. Les résultats représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants ± l'écart-type. L'expérience a été réalisée une fois, une deuxième expérience est en cours d'analyse.

L'inoculation de *Pst* induit une baisse des niveaux de NAD(H) et NADP(H) à 8 h et 24 hpi chez les lignées ctrl, *mAO1* et *mAO2* (Figure 86). Pour les surexpresses, il est intéressant de noter que les niveaux de NAD(H) et NADPH restent élevés à 8 hpi, à des niveaux comparables au Ctrl, puis baissent à 24 h, tout

en restant supérieurs au Ctrl. Ces résultats semblent indiquer que l'inoculation de *Pst* induit une baisse de synthèse du NAD/P(H) et/ou une consommation accrue du NAD/P(H), visible dès 8 hpi. Nous avons vu précédemment que l'expression du gène *AO* est stimulée par *Pst* entre 8 et 48 hpi (**Figure 85**). S'il y a effectivement diminution de la biosynthèse du NAD, alors il faut émettre l'hypothèse supplémentaire d'une régulation négative post-traductionnelle de l'activité *AO* ou alors une autre étape de régulation, plus en aval dans la voie de biosynthèse du NAD. Chez les surexprimeurs, cette baisse est plus tardive et pourrait être en faveur d'une consommation accrue du NAD/P(H) chez les plantes, masquée à 8 h du fait de la surexpression de l'*AO*.

Chez les plantes Ctrl, une légère oxydation du NADP est observée à 8h et 24 hpi (**Figure 86**). Le pool de NAD semble être au contraire légèrement suréduit au même temps. Chez les mutants *mAO1*, les pools de NAD et NADP semblent être oxydés à 8 h, mais seulement de façon transitoire. Dans les deux lignées surexprimeurs, une oxydation accrue des pools de NAD et NADP est observée à 8 et 24 hpi comparé aux plantes Ctrl. L'inoculation de *Pst* n'induit donc pas de changement drastique dans l'état redox des pools de NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ chez les plantes Ctrl et *mAO*, mais semble conduire à une oxydation accrue de ces pools chez les surexprimeurs. Afin de vérifier s'il y a en parallèle modification de l'homéostasie redox cellulaire en réponse à *Pst* dans les différentes lignées, deux formes du glutathion, le GSH (forme réduite) et le GSSG (forme oxydée) ont été dosées et les ratios GSSG/GSH calculés (**Figure 87**).

Cette expérience, très préliminaire, montre une oxydation accrue du glutathion et donc une modification de l'état redox cellulaire chez les Ctrl 8 et 24 h après inoculation de *Pst*. Cette oxydation semble être plus forte chez les mutants *mAO1* et *mAO2*, en tout cas au temps 8 hpi, mais semble plutôt être liée à une sensibilité accrue au traitement MgCl_2 , qui pourrait également induire un stress oxydant. Chez les surexprimeurs, l'état redox semble être contrôlé à 24 hpi car le pool de glutathion oxydé reste à un niveau comparable par rapport au traitement MgCl_2 ou au temps 0. Il ne semble donc pas y avoir de modification de l'homéostasie redox chez les surexprimeurs, tandis qu'une accumulation de NAD/P^+ est observée.

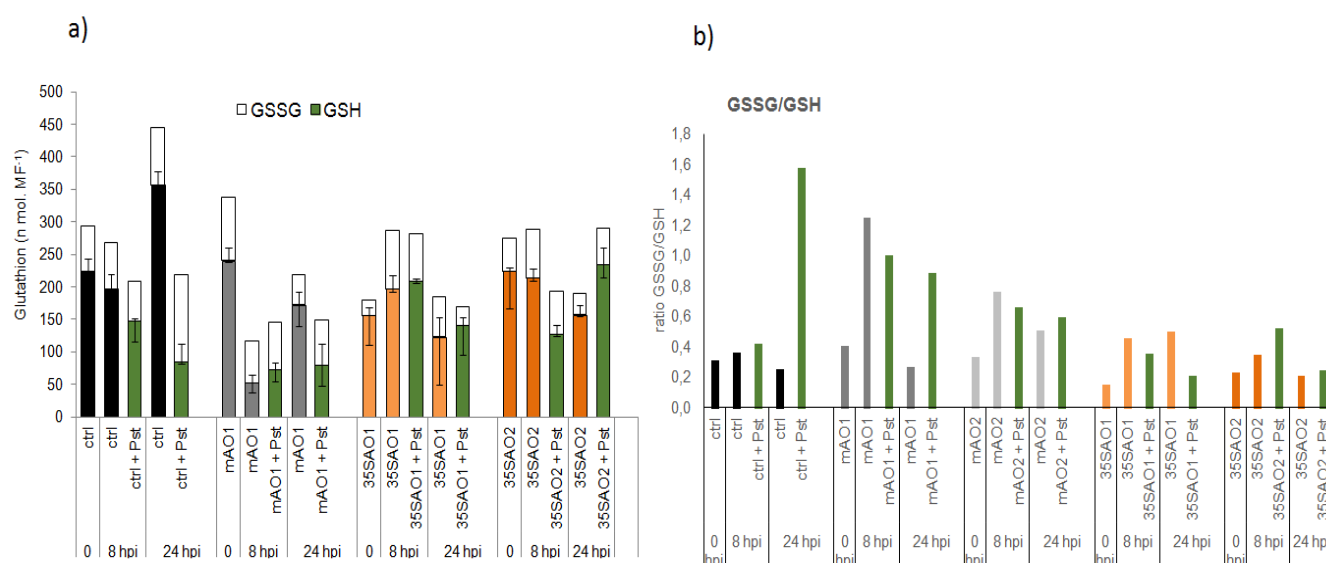


Figure 87 : Evolution des teneurs en GSSG, GSH et ratios GSSG/GSH après inoculation de *Pst* sur les plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, mAO et 35S::AO. Les plantes ont été inoculées par infiltration de *Pst* (10^7 cfu.mL⁻¹) ou de MgCl₂ (10 mM) dans les tissus foliaires. Les niveaux de GSSG (forme oxydée du glutathion), GSH (forme réduite) ont été dosés par spectrophotométrie aux temps 0 h (correspond à des feuilles infiltrées avec du MgCl₂ et immédiatement prélevées), 8 et 24 h après inoculation de *Pst* (indiqués + *Pst* sur la figure) ou de MgCl₂ (correspond aux échantillons 'ctrl', 'mAO1', 'mAO2', '35SAO1', '35SAO2' sur la figure) et exprimés en nmoles par g de matière fraîche. Le ratio GSSG/GSH a été calculé pour chaque condition. Les résultats représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants \pm l'écart-type. L'expérience a été réalisée une fois, une deuxième expérience est en cours d'analyse.

G- Les défenses basales sont modifiées dans les lignées mAO et 35S::AO

L'expression de gènes marqueurs des défenses d'*Arabidopsis thaliana* a ensuite été analysée dans les différentes lignées, en conditions normales de culture (**Figure 88**) et après inoculation de *Pst* (**Figure 89**). Les gènes *WRKY70*, codant pour un facteur de transcription, *PR-1* et *PR-5*, codant des protéines antimicrobiennes, ont été étudiés. L'expression de ces gènes est induite chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à *Pst* et dépend notamment de la voie de signalisation du SA, qui joue un rôle important dans la résistance à *Pst* (Vlot et al., 2009). L'accumulation de ces transcrits est faible en conditions normales de culture (**Figure 87**). Les lignées *mAO1* et *mAO2* accumulent 2 à 7 fois moins de *WRKY70*, *PR-1* et *PR-5* en comparaison à la plante Ctrl (**Figure 88**). Les lignées surexpressesurs 35S::AO1 et 35S::AO2

accumulent au contraire significativement plus de transcrits que la plante Ctrl. Il est intéressant de noter que sur des échantillons similaires, des analyses préliminaires en LC-MS ont montré que les niveaux de SA sont constitutivement plus élevés chez les surexprimeurs, corrélant ainsi accumulation de la phytohormone et effet signalisation sur des défenses SA-dépendantes (données non montrées).

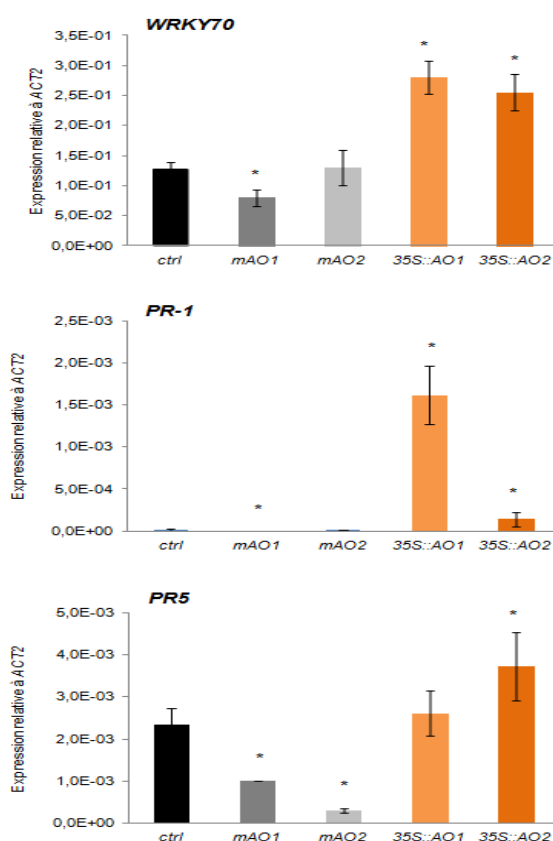


Figure 88 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de gènes marqueurs des défenses *WRKY70*, *PR-1* et *PR-5* des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO* en conditions physiologiques de croissance. Des feuilles bien développées de rosettes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 6 semaines ont été prélevées après 2 h d'illumination, en conditions de culture jours courts. Les niveaux de transcrits ont été mesurés par RT-qPCR, et exprimés en expression relative par rapport aux niveaux de transcrits du gène de référence *ACT2*. Les résultats représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants (et deux réplicatas techniques par échantillon) \pm l'erreur standard et sont représentatifs de deux expériences indépendantes. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test t de Student. Pour *PR-1*, le niveau d'expression relatif chez le ctrl est de $1,51E-05$ et de $5,22E-06$ pour *mAO1*.

L'expression des gènes *ICS1* (codant l'ISOCHORISMATE SYNTHASE 1, impliquée dans la biosynthèse du SA), *PR-1* et *PR-5* a ensuite été analysée en réponse à *Pst* (**Figure 89**). Les transcrits *ICS1* s'accumulent à partir de 24 h après inoculation de *Pst* chez les plantes Ctrl, tandis que les transcrits *PR-1* et *PR-5* s'accumulent plus tardivement, à 48 hpi. Chez *mAO1*, les transcrits *ICS1* et *PR-1* s'accumulent à un niveau plus faible à 24 hpi par rapport au Ctrl. Les surexpressseurs accumulent au contraire des niveaux de transcrits plus forts et de façon plus précoce par rapport au *Ctrl*. Par exemple, les transcrits *PR-1* et *PR-5* s'accumulent dès 8 hpi.

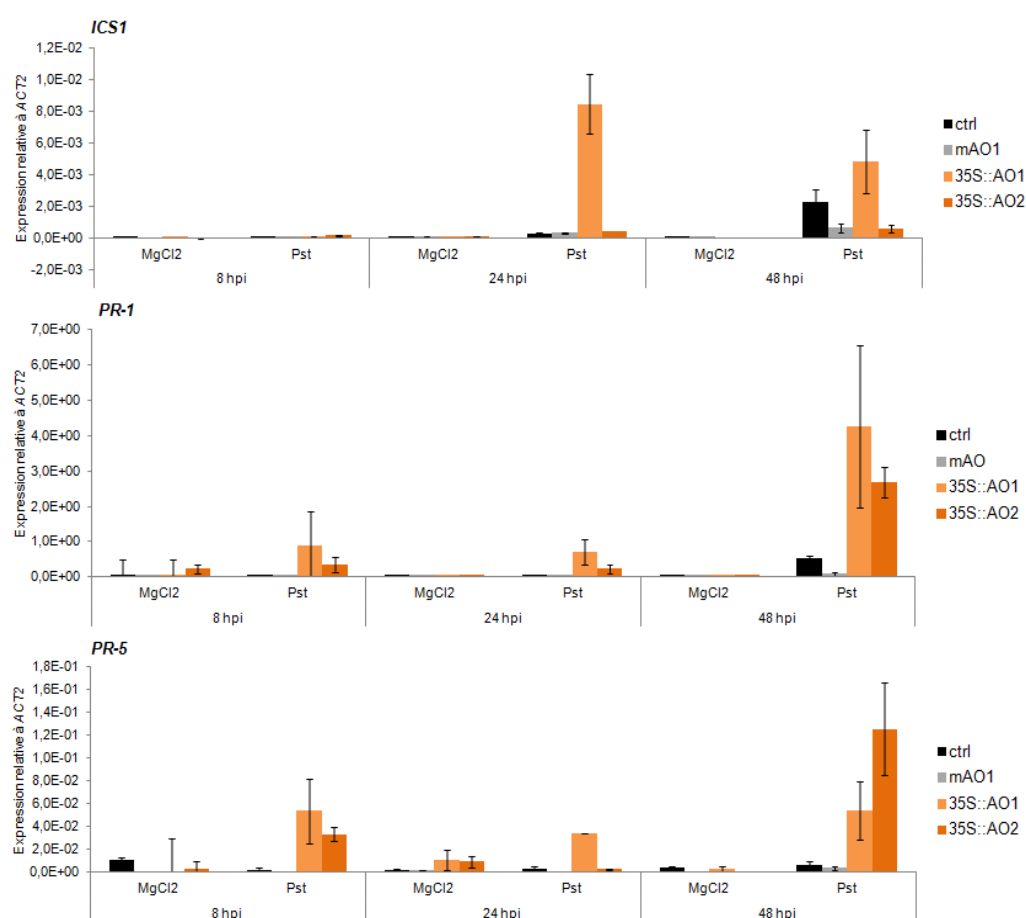


Figure 89 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes marqueurs des défenses *ICS1*, *PR-1* et *PR-5* après inoculation de *Pst* sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO1* et *35S::AO1* et 2. Les plantes ont été inoculées par infiltration de *Pst* (10^7 cfu.mL⁻¹) ou de MgCl₂ (10 mM) dans les tissus foliaires des plantes contrôle (Ctrl), et des lignées *mAO* et *35S::AO*. Les niveaux de transcrits sont exprimés en expression relative par rapport aux niveaux de transcrits du gène de référence *ACT2*. Les résultats représentent la moyenne de trois échantillons biologiques indépendants (et deux réplicats techniques par échantillon) ± l'erreur standard et sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

En parallèle, les quantités d'acide salicylique ont été dosées par HPLC dans les tissus des différentes lignées, à 8 et 24 h après inoculation de *Pst* ou de $MgCl_2$, comme traitement témoin. Dans cette expérience préliminaire, la forme libre, biologique active du SA a été dosée. Les résultats obtenus semblent indiquer une accumulation plus forte de SA dans les tissus des deux lignées qui surexpriment l'AO, 24 hpi de *Pst* (**Figure 90**). Une moindre accumulation de SA semble être détectée chez *mAO1* à 24 hpi, bien que ce résultat doit être vérifié.

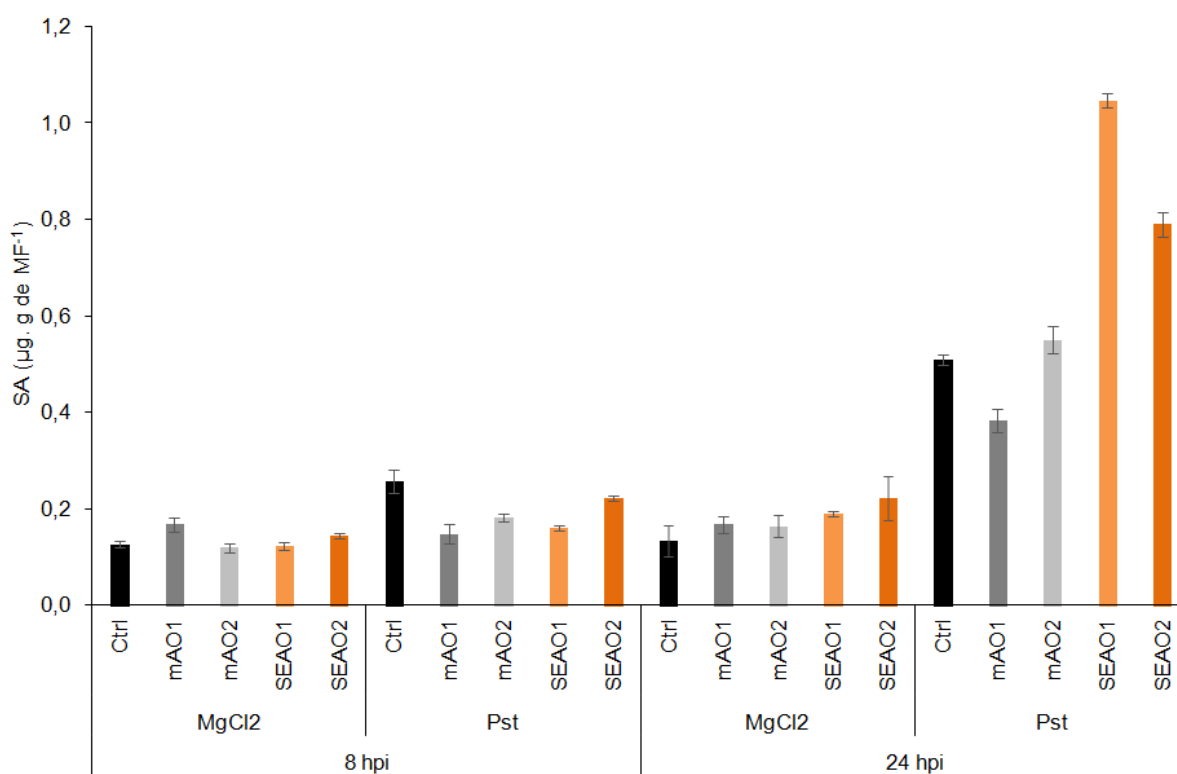


Figure 90 : Dosages par HPLC de l'acide salicylique (forme libre) après inoculation de *Pst* sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* des lignées Ctrl, *mAO* et *35S::AO*. Les plantes ont été inoculées par infiltration de *Pst* (10^7 cfu.mL⁻¹) ou de $MgCl_2$ (10 mM) dans les tissus foliaires des plantes contrôle (Ctrl), et des lignées *mAO* et *35S::AO*. Les niveaux de SA sont exprimés en µg de SA par g de matière fraîche foliaire. Les résultats représentent la moyenne de cinq échantillons biologiques indépendants ± l'erreur standard. Une seule expérience a été réalisée.

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que les lignées qui sous-expriment l'AO ont des défenses basales affaiblies, avant l'attaque de *Pst*, mais également en réponse à *Pst*, tandis que les surexprimeurs de l'AO ont au contraire des défenses accrues avant et après le contact avec *Pst*.

H- L'AO est impliquée dans la résistance à *Botrytis cinerea*, un champignon nécrotrophe

Un test de résistance des lignées a également été réalisé vis-à-vis d'un champignon nécrotrophe, *Botrytis cinerea*, afin de mettre en évidence un rôle plus général de l'AO et du NAD dans les résistances à différents types d'agents pathogènes, comme suggéré en **Figure 82**. Des inoculations de *B. cinerea* ont été réalisées par dépôt de 2 gouttelettes de 5 μ L d'une suspension de spores à 5.10^5 spores/mL dans du milieu PDB1/2. Chaque gouttelette a été déposée sur la face supérieure de feuilles bien développées de plantes âgées de 6 semaines, de part et d'autre de la nervure principale. Les premiers symptômes de macération de tissus sont visibles dès 24 hpi, sous la forme d'une nécrose circulaire d'aspect humide. Le développement de cette lésion, représentative de la propagation du champignon au sein des tissus, a été quantifié en mesurant le diamètre de chaque lésion, 96 hpi. Les résultats indiquent que le mutant *mAO1* est plus sensible à *B. cinerea* que la plante Ctrl, car les lésions développées sont plus larges (**Figure 91**). Au contraire, les deux surexprimeurs sont plus résistants, avec des lésions environ 40% plus petites que chez les Ctrl. La modulation des niveaux d'expression de l'AO a donc bien un effet sur le niveau de résistance à ce champignon nécrotrophe.

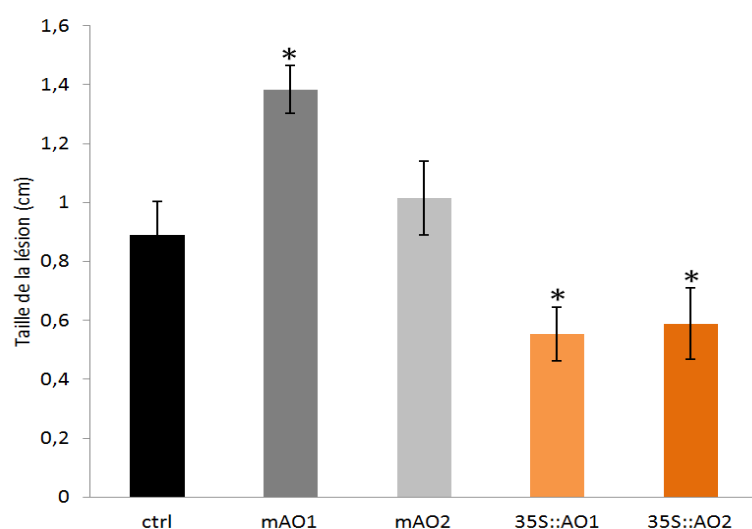


Figure 91 : Test de résistance au champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. Les inoculations de *B. cinerea* ont été réalisées par dépôt de 2 gouttelettes de 5 μ L d'une suspension de spores à 5.10^5 spores/mL préparée dans du milieu PDB1/2. Chaque gouttelette a été déposée sur la face supérieure de feuilles bien développées de plantes âgées de 6 semaines, de part et d'autre de la nervure principale. Trois jours après inoculation, un diamètre de chaque lésion a été mesuré. Les résultats représentent la moyenne de quinze lésions analysées sur trois plantes différentes \pm l'erreur standard. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

Les résultats représentent la moyenne de quinze lésions analysées sur trois plantes différentes \pm l'erreur standard. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives entre les Ctrl et les autres lignées à $P < 0,05$ pour le test *t* de Student.

II. Discussion et conclusions

A- L'homéostasie du NAD/P(H) influence la résistance aux agents pathogènes chez *Arabidopsis*

En résumé, ce travail montre que les lignées altérées dans l'expression de l'AO et l'accumulation de NAD/P(H) présentent une altération de leur résistance à la souche virulente de la bactérie hémibiotrophe *Pst* ainsi qu'à une souche du champignon nécrotrophe virulent *B. cinerea*. Une accumulation réduite de NAD/P(H) chez les mutants *mAO1* et *mAO2* conduit à une sensibilité accrue des plantes à *Pst* et *B. cinerea*, tandis qu'une accumulation du NAD/P(H) chez les lignées surexprimeuses est associée à une meilleure résistance à *Pst* et *B. cinerea*. Nos résultats montrent également que le niveau de NAD est corrélé au niveau d'expression des défenses de la plante. Ainsi, une accumulation accrue, constitutive, du NAD chez les surexprimeuses de l'AO confère aux plantes un niveau plus élevé d'expression des défenses basales, avant toute attaque d'un agent pathogène (augmentation des niveaux de transcrits *WRKY70*, *ICS1*, *PR-1*, *PR-5* et des niveaux de SA). Les plantes présentent ensuite une induction des défenses plus rapide et amplifiée lorsqu'elles sont inoculées avec *Pst*, ce qui contribue très certainement à conférer à la plante un plus haut niveau de résistance à ce pathogène.

Ces observations vont dans le sens des résultats obtenus précédemment au laboratoire et par d'autres équipes de recherche quant à un lien entre teneurs en NAD/P(H) et immunité des plantes. Au laboratoire, Pétriacq et al. (2012) ont montré que les lignées *nadC* d'*Arabidopsis thaliana*, surexprimant un homologue bactérien de la QPT d'*Arabidopsis*, présentent une stimulation des réactions de défense et une résistance accrue à la bactérie avirulente *Pst-AvrRpm1*. En présence de quinolinate, le substrat de la QPT, une synthèse accrue de NAD(H) et NADP(H) est observée dans ces lignées. Une analyse en transcriptomique a mis en évidence que 10 % des gènes régulés par l'augmentation des teneurs en NAD/P(H) correspondent à des gènes impliqués dans la défense d'*Arabidopsis thaliana* vis-à-vis des microorganismes. Les gènes *ICS-1* et *PR-1*, notamment, dont l'expression dépend de la voie de signalisation du SA (Vlot et al., 2009), voient leur expression induite lorsque les niveaux de NAD/P(H) augmentent, en parallèle à une accumulation de SA, suggérant un effet du NAD sur la synthèse du SA et sa signalisation.

De même, des plantes mutées pour l'activité Nudix hydrolase NUDT7 (une ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase), et accumulant spécifiquement plus de NADH, présentent une meilleure résistance à différents agents biotrophes et hémibiotrophes, comme *Pst*, *Pst-AvrRpm1*, *Pst-AvrRpt2*, *H. arabiopsidis*, en lien avec une stimulation des réactions de défense (expression de gènes de défense et accumulation de SA) (Bartsch et al., 2006; Jambunathan & Mahalingam, 2006; Ge et al., 2007; Adams-Phillips et al., 2008; Ge and Xia, 2008; Jambunathan et al., 2010).

Enfin, l'application exogène de NAD/P(H) sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* conduit à l'induction de l'expression de gènes de défense codant des protéines PR ainsi qu'à une meilleure résistance à la bactérie virulente *P. syringae* pv. *Maculicola* (Zhang & Mou, 2009).

L'ensemble de ces exemples semblent indiquer un lien fort entre la synthèse de NAD et les défenses dépendantes de la voie de signalisation du SA. Il est classiquement considéré que le SA serait plutôt impliqué dans la résistance aux agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes tandis que l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) seraient plutôt impliqués dans la résistance aux agents nécrotrophes (Glazebrook, 2005). Un dialogue antagoniste existerait entre les voies du SA et JA/ET pour contrôler finement les voies de signalisation mises en jeu en réponse à un agent pathogène donné (Koornneef et Pieterse, 2008). Or, nous avons montré que les lignées AO sont affectées non seulement dans la résistance à un agent pathogène hémibiotrophe (*P. syringae*) mais également dans leur résistance au nécrotrophe *B. cinerea*. L'implication de chaque phytohormone dans les mécanismes de défense ainsi que les interactions entre les voies de signalisation sont plus complexes que le simple schéma présenté précédemment et le SA, par exemple, a été montré comme jouant également un rôle dans la résistance au nécrotrophe *B. cinerea* (Govrin & Levine, 2002). En outre, il est possible que les variations de teneurs en NAD/P(H) impactent plus largement la résistance à divers pathogènes, soit 1) grâce à une stimulation de la voie du SA soit 2) grâce à l'activation d'autres voies de signalisation, comme celle impliquant par exemple les hormones JA et ET. Ce dernier scénario est très probable car Petriacq et al. (2012) avaient montré, par des analyses en transcriptomique, que l'expression de gènes dépendant de la voie de signalisation du JA, *GLIP1*, *CEJ1* et *JAZ8*, était induite lors

de l'accumulation de NAD/P(H) dans les lignées inductibles *nadC*. Il serait intéressant de caractériser l'expression d'autres gènes de défense, par exemple JA et ET-dépendants, dans les lignées AO. A cet effet une analyse en transcriptomique des lignées *mAO* et *35S::AO* est prévue.

B- L'AO : Impliquée dans la résistance basale à *Pst*, mais pas dans la résistance spécifique à *Pst-AvrRpm1* ?

Nos résultats montrent que l'AO est impliquée dans la résistance basale à *Pst* mais n'a pas d'effet sur la résistance spécifique à *Pst-AvrRpm1*, faisant intervenir une résistance de type ETI. Ce travail a permis en outre de montrer que l'AO intervient à la fois au niveau des cellules épidermiques (cellules de gardes) mais également au niveau des cellules du mésophylle.

1- Rôle de l'AO dans la PTI et la fermeture des stomates

L'analyse préliminaire du niveau de sensibilité des lignées AO après pulvérisation des bactéries à la surface des feuilles a mis en évidence une plus grande sensibilité des mutants *mAO1* et une plus grande résistance des lignées surexprimeurs à *Pst*, qui pourrait s'expliquer par des stomates plus ouverts chez les mutants et au contraire des stomates plus fermés chez les surexprimeurs (comme montré au temps 2 hpi). Il reste à déterminer de façon plus précise si ces lignées sont affectées dans la vitesse ou dans le degré de fermeture et ou réouverture des stomates en réponse à *Pst*. Une modulation de l'ouverture des stomates contrôlée par les niveaux d'AO accélérerait ou au contraire ralentirait ainsi la pénétration et multiplication des bactéries dans le mésophylle. Il est intéressant de signaler que les surexprimeurs possèdent moins de stomates par unité de surface, mais ces derniers sont plus gros donc avec des ostioles certainement plus larges en comparaison avec les Ctrl et *mAO* (**Figure 52, chapitre III**). Une plus grande fermeture associée à un nombre réduit de stomates pourrait ainsi expliquer la meilleure résistance des surexprimeurs à *Pst*. Macho et al. (2012) ont obtenu des résultats similaires quant au lien entre expression du gène AO et degré d'ouverture des stomates. Ces auteurs ont ainsi montré que l'AO interviendrait notamment dans les processus de signalisation cellulaire conduisant à la régulation de la fermeture des stomates suite à la perception de MAMPs bactériens et au déclenchement de la

PTI dans les cellules de garde. Cette fermeture précoce des stomates est influencée par le niveau d'expression de l'AO et est dépendant du gène *RBOHD* codant la NADPH oxydase D. Dans ce modèle, l'AO jouerait un rôle important pour fournir du NAD(P)H, utilisé entre autre par la NADPH oxydase pour produire des ROS (formes actives de l'oxygène). Ces ROS interviennent comme molécules de signalisation pour participer à la fermeture des stomates (Melotto et al., 2006). Pour confirmer nos résultats, il faudra reproduire cette expérience avec une cinétique plus complète pour observer le comportement des stomates et utiliser la bactérie *Pst COR*, qui induit la fermeture des stomates mais n'est pas capable de stimuler leur réouverture. Il serait intéressant également de réaliser des mesures d'échanges gazeux dans ces conditions, qui permettent notamment d'analyser la conductance stomatique, représentative du degré d'ouverture des stomates. Cette technique sera certainement plus précise que celle employée ici.

Egalement, dans leur article, Macho et al. n'ont pas pu mettre en évidence une plus grande sensibilité des lignées *fin* en réponse à la bactérie *Pst* (pulvérisée) et ne se sont pas intéressés au niveau de résistance après infiltration de la bactérie dans les tissus. Ils n'ont donc pas généralisé leur modèle AO-PTI à la PTI mise en place au niveau des cellules du mésophylle. Nous avons observé une plus grande sensibilité des *mAO* et une plus grande résistance des surexprimeurs à *Pst* après infiltration, ce qui suggère également un rôle de l'AO dans la résistance de type PTI du mésophylle à *Pst*. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions infiltrer de la flagelline dans les feuilles des différentes lignées et analyser divers événements de signalisation associés à la mise en place de la PTI (SA, ROS, expression de gènes de défense) afin de savoir si celle-ci est altérée par les teneurs en NAD/P(H).

2- Un rôle pour l'AO et le NAD/P(H) dans l'ETI ?

Les lignées *mAO* et *35S::AO* n'ont pas montré d'altération dans leur niveau de résistance à la bactérie avirulente *Pst-AvrRpm1*. Ce résultat est cohérent avec le travail de Macho et al. (2012) qui n'avaient pas non plus vu de phénotype avec leur lignée *fin4-3* (correspondant à *mAO1*) en réponse à *Pst-AvrRpm1*. Cependant leur lignée ne montrait pas non plus de sensibilité accrue à la bactérie *Pst*. D'autres travaux comme ceux de Pétriacq et al. (2012) ont rapporté une résistance accrue de

leur lignée accumulant du NAD/P(H) à *Pst-AvrRpm1*, sans que le niveau de résistance basale à *Pst* soit altéré. Les résultats apparaissent donc assez contradictoires d'une étude à l'autre et ne permettent pas de proposer des conclusions simples sur le ou les rôles possibles du NAD dans les différents types d'immunités. Nous proposons ici quelques hypothèses pour expliquer ces différences, comme base aussi de réflexions pour redéfinir les stratégies expérimentales employées pour étudier le lien entre NAD et immunité.

- La première hypothèse concerne les différences dans les conditions expérimentales (environnementales) employées entre laboratoires. Différents facteurs environnementaux comme la lumière (qualité, quantité), la température, l'état nutritionnel/physiologique des plantes ... ont récemment été montrés comme pouvant interagir avec les signaux biotiques impliqués dans la mise en place de l'immunité chez *Arabidopsis thaliana* (Bolton, 2009; Hua, 2013). La lumière, par exemple, intervient via la photosynthèse, sur la capacité de la plante à mettre en place une réponse immunitaire forte et efficace (Roden & Ingle, 2009). En fonction des conditions de culture, un mutant présentant des niveaux modifiés en NAD/P(H) pourra potentiellement présenter des altérations variables de ses paramètres photosynthétiques et donc des degrés variables de sensibilité aux agents pathogènes. L'hypothèse présentée ici peut être illustrée par les différents travaux autour de la lignée *Atnudt7-1*. Jusqu'en 2010, des travaux contradictoires sur la lignée *Atnudt7-1* avaient été publiés, certains chercheurs ayant rapporté un phénotype pour cette lignée (croissance et résistance altérées aux agents pathogènes), d'autres pas de phénotype (Bartsch et al., 2006; Jambunathan & Mahalingam, 2006 ; Ge et al., 2007; Adams-Phillips et al., 2008; Ge & Xia 2008; Jambunathan et al., 2010). En 2010, Jambunathan et al. ont cultivé cette lignée dans différents substrats de culture et ont pu mettre en évidence que dans un substrat riche (notamment en N, P, K, Ca et Mg), les plantes se développent normalement et ne sont pas plus sensibles aux agents pathogènes, tandis que lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu plus pauvre, leurs rosettes sont plus petites et les plantes présentent une résistance accrue à *Pst* (mais pas à *Pst-AvrRpt2*). La culture en milieu pauvre induit l'expression basale de *ATNUDT7* chez les plantes WT et *atnudt7-1*, ainsi qu'une accumulation de NAD(H) et une altération des pools d'antioxydants (ascorbate et glutathion). Dans ce contexte, il faut noter qu'aucun des

mutants d'insertion ADN-T dans le gène *AO* n'est complètement ko (plus de transcrits et activité *AO* nulle) et que le niveau d'expression de l'*AO* lui-même pourrait varier de façon similaire à *AtNUD7* en fonction des conditions de culture, modifiant ainsi l'état basal des plantes. Nos conditions de culture et celles de Macho et al. (2012) n'étant pas les mêmes (durée de la lumière notamment), nous pouvons prendre en compte cette hypothèse pour expliquer les différences de phénotypes observées pour les lignées *fin/mAO*. Il serait intéressant de retester, dans les mêmes conditions, un certain nombre de lignées altérées pour les teneurs en NAD : les lignées *mAO*, les lignées mutées pour la QPT (disponibles au laboratoire, non publiées), les lignées *Atnudt* etc... Il serait intéressant aussi de tester le phénotype de ces plantes vis-à-vis des agents pathogènes dans différentes conditions de culture et d'inoculation, en faisant varier par exemple le paramètre lumière (ex : jours courts *versus* jours longs) et le substrat de culture. Ces analyses semblent indispensables si on envisage une stratégie d'amélioration variétale visant les teneurs en NAD chez une plante cultivée.

- L'hypothèse précédente est valable pour des lignées mutées qui expriment encore, à des niveaux variables, l'allèle sauvage fonctionnel d'un gène, mais pas pour des lignées surexpresses qui expriment de façon constitutive (ex *35S::AO*) ou inductible (ex *nadC*), et à un niveau élevé, un transgène. Dans ce cas, il est nécessaire de discuter des différentes stratégies expérimentales employées entre les études et qui concernent le type de surexpression (quel(le) gène/protéine, dans quel compartiment ?), et le niveau de NAD/P(H) accumulé en résultant. Dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi de cibler la première étape de biosynthèse *de novo* du NAD et de modifier son expression par sous-expression ou surexpression. La surexpression a été réalisée avec une construction ciblant l'*AO* vers son compartiment d'origine, le chloroplaste (Kato et al., 2006). Petriacq et al. (2012) ont choisi de surexprimer un homologue bactérien de la protéine QPT dans le cytosol. L'absence de quinolinate dans le cytosol oblige alors à apporter le quinolinate de façon exogène, afin d'induire une accumulation de NAD/P(H). Ainsi, cette stratégie expérimentale a pu apporter deux biais dans les résultats 1) le quinolinate et la façon dont on l'apporte (infiltration par exemple) peut potentiellement modifier la physiologie de la plante (ex : légère expression de *PR-1*) (Pétriacq et al., 2012) et 2) la délocalisation dans le cytosol de l'étape finale de la biosynthèse *de novo* du NAD

peut altérer la répartition des métabolites entre les compartiments (ex : NaMN et métabolites dérivés comme le nicotinate). La suraccumulation de nicotinate observée chez *nadC* (Pétriacq et al. 2012) pourrait par exemple conduire à des variations d'alcaloïdes à pyridine, comme la putrescine, molécule détectée chez *Arabidopsis thaliana* et qui possède des propriétés défensives contre *Pst* (Kim et al., 2013). Cependant, ce système inductible s'est révélé très efficace puisqu'en présence de quinolinate, les plantes accumulent environ 5 fois plus de NAD⁺ et 1,5 à 2 fois plus de NADH que la lignée 35S::AO1 (les niveaux de NADP⁺ et NADPH sont peu différents entre les deux types de surexprimeurs, dans des conditions similaires de culture). Ces plantes accumulent également 5 fois plus de SA dans sa forme libre (SAL), active, que la lignée 35S::AO1. Il est possible que l'accumulation accrue de NAD(H) et/ou de SA stimulent ou potentialisent des défenses qui jouent un rôle particulier dans la mise en place de l'ETI. Une plante WT Col-0 d'*Arabidopsis thaliana* accumule environ 1 à 2 µg de SAL (5 µg de SA total) 10 h après inoculation de *Pst-AvrRpm1* et 6 µg de SAL (12 µg de SA total) après 24 h (Simon et al., 2010; Pétriacq et al., 2012). En conditions non inoculées, *nadC* accumule déjà 1,5 µg de SAL et 10 µg de SA total, ce qui place la plante dans des conditions similaires aux niveaux de SA rencontrés lors de la mise en place de l'ETI, mais sans aboutir à la mort cellulaire. A titre de comparaison, 35S::AO1 n'atteint que 1 µg de SAL 24hpi de *Pst*. On peut dès lors comprendre que les défenses basales de la lignée 35S::AO1 ne soient pas suffisamment 'boostées' pour permettre une meilleure résistance à *Pst-AvrRpm1*, mais il est difficile de comprendre que *nadC* ne soit pas plus résistante à *Pst*, le SA jouant un rôle important dans la résistance à cette bactérie (Glazebrook, 2005). Le niveau de NAD(H) pourrait constituer un facteur différenciant l'ETI de la PTI. Cette idée est renforcée par l'observation qu'en réponse à *Pst-AvrRpm1*, les niveaux de NADH sont considérablement augmentés (Pétriacq et al., 2012) tandis qu'en réponse à *Pst*, il y a baisse du NADH (ce travail). Il a récemment été montré qu'un oomycète pathogène du soja, *Phytophthora sojae*, sécrète chez son hôte un effecteur de virulence, Avr3b, qui présente une activité ADP-ribose/NADH pyrophosphorylase. En ciblant la dégradation de l'ADP-ribose et du NADH de son hôte, ce pathogène arriverait à contrecarrer les mécanismes d'ETI (Dong et al., 2011). L'ADP-ribose, le NADH (ainsi que tous les nucléotides ou métabolites en découlant) sont impliqués à différents niveaux dans la réponse des plantes aux agents pathogènes (Pétriacq et al., 2013 et introduction de ce manuscrit de thèse). Il

apparaît clairement que cibler cette classe de métabolites est un enjeu pour l'agent pathogène afin d'exercer sa virulence sur son hôte. Maintenir un niveau adéquat de NAD/P(H) dans la plante peut lui permettre de mieux résister, comme nous avons pu l'observer chez les lignées 35S::AO.

C- Quel(s) rôle(s) pour l'AO et le NAD/P(H) dans la résistance basale à *Pst* ?

Il est reconnu depuis quelques années que le NAD, NADP et leurs dérivés comme l'ADP-ribosyl jouent un rôle dans la signalisation cellulaire, particulièrement en réponse aux agents pathogènes. Ces nucléotides à pyridine sont impliqués dans la signalisation calcique, l'homéostasie redox cellulaire, la réparation de l'ADN par poly-ADP-ribosylation ou la modification post-traductionnelle des protéines par désacétylation (pour revue, Noctor et al., 2006; Pétriacq et al., 2013). Un autre élément, insuffisamment pris en compte dans la compréhension des mécanismes de défense liés au NAD, concerne le métabolisme primaire et oxydatif des plantes. Nous discuterons ci-dessous des modifications de l'état redox et du métabolisme primaire chez les lignées *mAO* et 35S::AO et de leurs impacts potentiels sur la résistance des plantes à *Pst*.

En 2010, une analyse du métabolisme d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisée à différents temps au cours de la mise en place de la maladie induite par *Pst* (Ward et al., 2010). Ce travail a permis de montrer que la bactérie est capable de reconfigurer le métabolisme de la plante (primaire, secondaire et oxydatif) afin de détourner, à son bénéfice, les métabolites nécessaires pour accroître sa population dans le milieu extracellulaire des tissus colonisés. Les auteurs ont ainsi mis en évidence de rapides altérations (dès 8 hpi) dans les pools d'acides aminés, de composés azotés, de composés spécifiques comme les glucosinolates, certains disaccharides ou encore des molécules impliquées dans le contrôle des ROS. Les auteurs ont notamment montré l'accumulation de GABA et de proline, deux molécules à propriétés antioxydantes et qui pourraient permettre de contrôler les ROS produits par la plante lors de la mise en place de la PTI (Bouché & Fromm, 2004; Chen & Dickman, 2005). Nous avons observé une diminution ainsi qu'une oxydation des pools de glutathion chez les plantes Ctrl après inoculation de *Pst*, suggérant que les cellules subissent

un stress oxydant, avec une production accrue probable de ROS. Cette oxydation semble être plus forte chez les mutants *mAO* en réponse à *Pst*, mais elle est également observée après traitement par du $MgCl_2$, suggérant une production accrue de ROS en réponse aux deux types de stress, biotique et abiotique. Ce résultat semble indiquer une sensibilité particulière de l'état redox des mutants au stress et une génération accrue de ROS. Une diminution des teneurs en NAD/P(H) pourrait altérer directement l'activité des systèmes antioxydants (comme les activités du système ascorbate–glutathion, pour revue, Noctor, 2006) ou indirectement réduire l'expression des gènes codant ces systèmes. Egalement, un dysfonctionnement des chaînes de transfert d'électrons (notamment la chaîne photosynthétique) pourrait conduire à une génération accrue de ROS (Ivanov & Khorobrykh, 2003). Au contraire, les lignées surexpresses présentent un état redox beaucoup moins altéré à 24 hpi, avec un maintien de l'état redox du glutathion. L'activité NADPH oxydase, génératrice de ROS, est stimulée en réponse à *Pst* (Marino et al., 2012). Les ROS produits participent aux mécanismes de signalisation conduisant à la mise en place de la PTI. Si on fait l'hypothèse, d'après les travaux de Macho et al. (2012) que l'AO, notamment, fournit du NADPH pour faire fonctionner la NADPH oxydase et générer des ROS, alors il est possible que la synthèse de ROS soit accrue chez les surexpresses de l'AO. Comme l'état redox est maintenu, on peut postuler que les systèmes antioxydants sont stimulés dans ces lignées pour maintenir l'homéostasie redox cellulaire. Une analyse plus précise de l'état redox cellulaire devra être entreprise sur les lignées AO en réponse à *Pst*, avec par exemple la mesure d'activités antioxydantes et des dosages de pools de métabolites antioxydants (ascorbate-glutathion).

Pst induit une altération des capacités photosynthétiques des cellules attaquées (Bonfig et al., 2006). La suppression de la photosynthèse induirait notamment de profonds changements dans le métabolisme carboné, dont la bactérie tirerait profit (Bonfig et al., 2006; Ward et al., 2010). La bactérie induirait ainsi une accumulation de saccharose, puis stimulerait de façon concomitante les voies de biosynthèse du tréhalose et d'autres sucres, pouvant être utilisés par les bactéries comme sources énergétiques ou comme intermédiaires métaboliques (Ward et al., 2010). Chez les surexpresses, de meilleures capacités photosynthétiques et un maintien du métabolisme carboné en réponse à *Pst* pourraient ainsi permettre aux

plantes de mieux résister (et l'inverse chez les *mAO*). Le métabolisme des acides aminés ainsi que le métabolisme des composés azotés apparaissent également comme des composantes importantes de l'immunité des plantes vis-à-vis de *Pst* (Ward et al., 2010; Vitor et al., 2013; Zeier, 2013; Pastor et al., 2014). Ces métabolismes étant constitutivement modifiés dans les lignées *mAO* et *35S::AO*, il serait intéressant de les analyser, par une approche en métabolomique, après inoculation des plantes avec *Pst*.

Conclusion générale et perspectives

Le développement des plantes et leur fonctionnement dépend de cofacteurs comme le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Outre ses fonctions rédox, d'autres rôles lui ont récemment été attribués dans la signalisation cellulaire. Les plantes disposent de tout l'équipement nécessaire à la synthèse *de novo* de NAD à partir de l'aspartate. Ces dernières années, les caractéristiques des étapes enzymatiques intervenant dans la synthèse, l'utilisation par clivage et le recyclage du NAD, ont fait l'objet de plusieurs travaux. Lesdites études visaient à cerner l'importance des étapes enzymatiques dans la régulation des niveaux de NAD et dans le développement des plantes. Le fait que le nicotinamide adénine dinucléotide soit une molécule ubiquiste impliquée dans le métabolisme oxydo-réductif, notamment dans la respiration cellulaire, a aussi conduit plusieurs équipes à en étudier l'implication dans les mécanismes de détoxification en situation de stress, et d'analyser les relations existant entre métabolismes respiratoire, carboné et azoté. Le laboratoire a développé des recherches sur cette voie, aboutissant à une caractérisation de la troisième étape de la synthèse *de novo*, la quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT). Cette enzyme initie la production d'alcaloïdes à pyridine chez certaines espèces comme le tabac, et conduit à l'activation de défenses induites chez *Arabidopsis thaliana* (Pétriacq et al., 2012). Les travaux portant sur la voie dite *de novo* chez les plantes ont permis de démontrer (i) qu'il n'existe qu'une seule isoforme de chacune de ces enzymes chez les plantes, à l'exception du tabac, (ii) que les trois premières étapes sont toutes localisées dans les plastides, et (iii) que l'interruption de leur gène est létale à l'état homozygote (Hunt et al., 2004 ; Katoh & al, 2006 ; Noctor et al., 2006). La disponibilité des séquences dans les bases de données d'*Arabidopsis thaliana* et d'*Escherichia coli*, ainsi que l'existence des banques de mutants d'insertion ADN-T d'*Arabidopsis thaliana*, nous a ainsi conduit à développer un nouvel axe de recherche en Biologie Intégrative portant sur la biosynthèse du NAD au sein du laboratoire.

Les études conduites dans l'équipe en situation d'attaque pathogène, et les données transcriptomiques des bases de données, toutes suggèrent que l'aspartate oxydase (AO) exerce un fort contrôle sur la production de NAD en situation de stress et pour certains besoins développementaux (croissance des tubes polliniques). Chez

les bactéries, dont la voie de synthèse *de novo* débute par l'aspartate comme chez les plantes, l'AO est une flavoprotéine à FAD, qui est capable d'utiliser soit l'oxygène, soit le fumarate comme accepteur d'électrons, selon les conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose (Nasu et al., 1982). La séquence de la protéine bactérienne est très conservée avec celle des plantes (Noctor et al., 2006). L'enzyme est sujette à un fort contrôle transcriptionnel et biochimique (Griffith et al., 1975 ; Nasu et al., 1982). Le choix de cette enzyme à des fins de cible pour déréguler de manière constitutive la production de NAD chez les plantes, nous a permis d'obtenir des lignées mutantes *mAO* et surexprimant l'enzyme *35S ::AO*, qui constituent des outils de choix pour étudier l'impact des niveaux de NAD sur le métabolisme et la physiologie des plantes.

L'utilisation des méthodes de génétique inverse ciblant l'AO, enzyme engageant l'aspartate dans la voie de synthèse du NAD, a confirmé le rôle limitant de la protéine pour la production de NAD chez les végétaux supérieurs. Pour la première fois, il a été obtenu des plantes dont l'ensemble des niveaux de nucléotides à pyridine sont augmentés de manière constitutive. Nos observations indiquent que la dérégulation des niveaux de NAD s'accompagne d'une évolution dans le même sens des niveaux d'ATP. En surproduisant l'AO, nous avons ainsi obtenu des plantes dites « riches en énergie », alors que les mutants *mAO* sont déplétés en ces deux métabolites. Une caractérisation moléculaire, métabolique et physiologique a alors été engagée, tant en conditions environnementales normales qu'en situation de stress.

L'augmentation du niveau de nucléotides à pyridine dans les plantes surexpresses s'accompagne d'une forte augmentation de la vitesse de croissance (tant racinaire que foliaire), une germination plus rapide qui se maintient en situation de carence azotée, une production de biomasse et un rendement en graines fortement accrus. Ces caractéristiques développementales sont étroitement corrélées avec les niveaux de NAD dans les lignées transgéniques. On observe un effet diamétralement opposé chez les lignées mutantes, dont les teneurs en NAD sont sensiblement diminuées. Afin de suivre le niveau de production d'AO dans nos lignées, nous avons mis au point un protocole qui permet de mesurer pour la première fois dans des tissus végétaux l'activité extractible de l'enzyme. Nous avons

aussi pu mettre en évidence que l'enzyme produite *in planta* utilise le fumarate comme donneur d'électrons, et non l'oxygène moléculaire.

L'augmentation des teneurs en NAD renforce la machinerie photosynthétique et stimule fortement les échanges de carbone et de vapeur d'eau entre la plante et son milieu. La forte croissance qui en résulte s'accompagne cependant d'une diminution de l'efficacité d'utilisation de l'eau par les plantes (WUE). L'augmentation de biomasse constatée résulte aussi d'une activation des voies d'assimilation de l'azote et de la respiration cellulaire, étroitement coordonnées avec l'assimilation du carbone. A l'inverse, une diminution importante des teneurs en NAD conduit à une diminution drastique de la fixation du carbone, qui désorganise les métabolismes photosynthétique, respiratoire et azoté, en raison d'une forte limitation des échanges de dioxyde de carbone et de vapeur d'eau avec le milieu extérieur.

Si les plantes riches en NAD sont intrinsèquement plus résistantes aux altérations métaboliques qui résultent de stress abiotiques, leur faible efficacité d'utilisation de l'eau les rendent légèrement plus sensibles à des conditions de sécheresse. Pour autant, les plantes riches en NAD sont capables de croître dans des conditions de lumière et de chaleur intenses que l'espèce ne peut habituellement supporter. A l'inverse, les plantes mutantes pauvres en NAD, dont les échanges sont très limités dans les conditions actuelles de pression de vapeur d'eau et de CO₂, perdent moins d'eau et résistent davantage à la sécheresse dans des expériences menées au laboratoire. La différence de résistance à la sécheresse observée entre des plantes sauvages ou riches en NAD, et des plantes pauvres en NAD, s'accompagne d'une modification des réponses hormonales.

Une surproduction d'auxine et de glucosinolates est constatée chez les plantes pauvres en NAD, ce qui se traduit par une plus grande résistance à la multiplication des pucerons. Les plantes riches en NAD limitent aussi la prolifération des ravageurs et des agents pathogènes, probablement du fait d'une stimulation basale des mécanismes de défense des plantes. Cette pré-disposition des plantes riches en NAD leur permettrait de répondre de façon plus rapide et plus forte lors de l'attaque par la bactérie hémibiotrophe *Pseudomonas syringae* (*Pst*). Cela se traduit par une meilleure résistance à cette bactérie. Il est aussi observé un plus faible

diamètre des lésions chez les lignées 35S ::AO lors de l'infection par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. A l'opposé, le mutant *mAO* pauvre en NAD est davantage sensible aux infections.

L'utilisation d'une stratégie visant à déréguler de manière ciblée la première enzyme de la voie de biosynthèse du NAD, montre qu'à des altérations des niveaux de NAD sont associés des changements développementaux, métaboliques, hormonaux, physiologiques et probablement épigénétiques, en conditions normales de culture comme en situation de stress biotiques et abiotiques. Il conviendra d'approfondir la caractérisation moléculaire et métabolomique de ces plantes par des approches à large échelle, mais aussi de fluxomique isotopique, avant d'obtenir une image dynamique des régulations rédox, métaboliques et de signalisation cellulaire en leur sein. Aussi, avec le clonage de l'AO d'*Arabidopsis thaliana*, nous souhaitons poursuivre notre étude des propriétés biochimiques de l'enzyme. Cela permettra d'appréhender la régulation instantanée qui s'exerce sur cette étape limitante du métabolisme du NAD par les produits terminaux de la voie.

Enfin, nous avons engagé une procédure de dépôt de brevet auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle, pour valoriser notre stratégie de surproduction constitutive des niveaux de NAD conduisant à des plantes plus riches en énergie et aux rendements accrus. Nous avons entrepris des démarches en vue d'appliquer ce procédé à des plantes d'intérêt agronomique.

Conclusion générale & Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Le développement des plantes et leur fonctionnement dépend de cofacteurs comme le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Outre ses fonctions rédox, d'autres rôles lui ont récemment été attribués dans la signalisation cellulaire. Les plantes disposent de tout l'équipement nécessaire à la synthèse *de novo* de NAD à partir de l'aspartate. Ces dernières années, les caractéristiques des étapes enzymatiques intervenant dans la synthèse, l'utilisation par clivage et le recyclage du NAD, ont fait l'objet de plusieurs travaux. Lesdites études visaient à cerner l'importance des étapes enzymatiques dans la régulation des niveaux de NAD et dans le développement des plantes. Le fait que le nicotinamide adénine dinucléotide soit une molécule ubiquiste impliquée dans le métabolisme oxydo-réductif, notamment dans la respiration cellulaire, a aussi conduit plusieurs équipes à en étudier l'implication dans les mécanismes de détoxification en situation de stress, et d'analyser les relations existant entre métabolismes respiratoire, carboné et azoté. Le laboratoire a développé des recherches sur cette voie, aboutissant à une caractérisation de la troisième étape de la synthèse *de novo*, la quinolinate phosphoribosyltransférase (QPT). Cette enzyme initie la production d'alcaloïdes à pyridine chez certaines espèces comme le tabac, et conduit à l'activation de défenses induites chez *Arabidopsis thaliana* (Pétriacoq et al., 2012). Les travaux portant sur la voie dite *de novo* chez les plantes ont permis de démontrer (i) qu'il n'existe qu'une seule isoforme de chacune de ces enzymes chez les plantes, à l'exception du tabac, (ii) que les trois premières étapes sont toutes localisées dans les plastes, et (iii) que l'interruption de leur gène est létale à l'état homozygote (Hunt et al., 2004 ; Katoh & al, 2006 ; Noctor et al., 2006). La disponibilité des séquences dans les bases de données d'*Arabidopsis thaliana* et d'*Escherichia coli*, ainsi que l'existence des banques de mutants d'insertion ADN-T d'*Arabidopsis thaliana*, nous a ainsi conduit à développer un nouvel axe de recherche en Biologie Intégrative portant sur la biosynthèse du NAD au sein du laboratoire.

Les études conduites dans l'équipe en situation d'attaque pathogène, et les données transcriptomiques des bases de données, toutes suggèrent que l'aspartate oxydase (AO) exerce un fort contrôle sur la production de NAD en situation de stress et pour certains besoins développementaux (croissance des tubes polliniques). Chez

les bactéries, dont la voie de synthèse *de novo* débute par l'aspartate comme chez les plantes, l'AO est une flavoprotéine à FAD, qui est capable d'utiliser soit l'oxygène, soit le fumarate comme accepteur d'électrons, selon les conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose (Nasu et al., 1982). La séquence de la protéine bactérienne est très conservée avec celle des plantes (Noctor et al., 2006). L'enzyme est sujette à un fort contrôle transcriptionnel et biochimique (Griffith et al., 1975 ; Nasu et al., 1982). Le choix de cette enzyme à des fins de cible pour déréguler de manière constitutive la production de NAD chez les plantes, nous a permis d'obtenir des lignées mutantes *mAO* et surexprimant l'enzyme *35S ::AO*, qui constituent des outils de choix pour étudier l'impact des niveaux de NAD sur le métabolisme et la physiologie des plantes.

L'utilisation des méthodes de génétique inverse ciblant l'AO, enzyme engageant l'aspartate dans la voie de synthèse du NAD, a confirmé le rôle limitant de la protéine pour la production de NAD chez les végétaux supérieurs. Pour la première fois, il a été obtenu des plantes dont l'ensemble des niveaux de nucléotides à pyridine sont augmentés de manière constitutive. Nos observations indiquent que la dérégulation des niveaux de NAD s'accompagne d'une évolution dans le même sens des niveaux d'ATP. En surproduisant l'AO, nous avons ainsi obtenu des plantes dites « riches en énergie », alors que les mutants *mAO* sont déplétés en ces deux métabolites. Une caractérisation moléculaire, métabolique et physiologique a alors été engagée, tant en conditions environnementales normales qu'en situation de stress.

L'augmentation du niveau de nucléotides à pyridine dans les plantes surexpresses s'accompagne d'une forte augmentation de la vitesse de croissance (tant racinaire que foliaire), une germination plus rapide qui se maintient en situation de carence azotée, une production de biomasse et un rendement en graines fortement accrus. Ces caractéristiques développementales sont étroitement corrélées avec les niveaux de NAD dans les lignées transgéniques. On observe un effet diamétralement opposé chez les lignées mutantes, dont les teneurs en NAD sont sensiblement diminuées. Afin de suivre le niveau de production d'AO dans nos lignées, nous avons mis au point un protocole qui permet de mesurer pour la première fois dans des tissus végétaux l'activité extractible de l'enzyme. Nous avons

aussi pu mettre en évidence que l'enzyme produite *in planta* utilise le fumarate comme donneur d'électrons, et non l'oxygène moléculaire.

L'augmentation des teneurs en NAD renforce la machinerie photosynthétique et stimule fortement les échanges de carbone et de vapeur d'eau entre la plante et son milieu. La forte croissance qui en résulte s'accompagne cependant d'une diminution de l'efficacité d'utilisation de l'eau par les plantes (WUE). L'augmentation de biomasse constatée résulte aussi d'une activation des voies d'assimilation de l'azote et de la respiration cellulaire, étroitement coordonnées avec l'assimilation du carbone. A l'inverse, une diminution importante des teneurs en NAD conduit à une diminution drastique de la fixation du carbone, qui désorganise les métabolismes photosynthétique, respiratoire et azoté, en raison d'une forte limitation des échanges de dioxyde de carbone et de vapeur d'eau avec le milieu extérieur.

Si les plantes riches en NAD sont intrinsèquement plus résistantes aux altérations métaboliques qui résultent de stress abiotiques, leur faible efficacité d'utilisation de l'eau les rendent légèrement plus sensibles à des conditions de sécheresse. Pour autant, les plantes riches en NAD sont capables de croître dans des conditions de lumière et de chaleur intenses que l'espèce ne peut habituellement supporter. A l'inverse, les plantes mutantes pauvres en NAD, dont les échanges sont très limités dans les conditions actuelles de pression de vapeur d'eau et de CO₂, perdent moins d'eau et résistent davantage à la sécheresse dans des expériences menées au laboratoire. La différence de résistance à la sécheresse observée entre des plantes sauvages ou riches en NAD, et des plantes pauvres en NAD, s'accompagne d'une modification des réponses hormonales.

Une surproduction d'auxine et de glucosinolates est constatée chez les plantes pauvres en NAD, ce qui se traduit par une plus grande résistance à la multiplication des pucerons. Les plantes riches en NAD limitent aussi la prolifération des ravageurs et des agents pathogènes, probablement du fait d'une stimulation basale des mécanismes de défense des plantes. Cette pré-disposition des plantes riches en NAD leur permettrait de répondre de façon plus rapide et plus forte lors de l'attaque par la bactérie hémibiotrophe *Pseudomonas syringae* (*Pst*). Cela se traduit par une meilleure résistance à cette bactérie. Il est aussi observé un plus faible

diamètre des lésions chez les lignées 35S ::AO lors de l'infection par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. A l'opposé, le mutant *mAO* pauvre en NAD est davantage sensible aux infections.

L'utilisation d'une stratégie visant à déréguler de manière ciblée la première enzyme de la voie de biosynthèse du NAD, montre qu'à des altérations des niveaux de NAD sont associés des changements développementaux, métaboliques, hormonaux, physiologiques et probablement épigénétiques, en conditions normales de culture comme en situation de stress biotiques et abiotiques. Il conviendra d'approfondir la caractérisation moléculaire et métabolomique de ces plantes par des approches à large échelle, mais aussi de fluxomique isotopique, avant d'obtenir une image dynamique des régulations rédox, métaboliques et de signalisation cellulaire en leur sein. Aussi, avec le clonage de l'AO d'*Arabidopsis thaliana*, nous souhaitons poursuivre notre étude des propriétés biochimiques de l'enzyme. Cela permettra d'appréhender la régulation instantanée qui s'exerce sur cette étape limitante du métabolisme du NAD par les produits terminaux de la voie.

Enfin, nous avons engagé une procédure de dépôt de brevet auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle, pour valoriser notre stratégie de surproduction constitutive des niveaux de NAD conduisant à des plantes plus riches en énergie et aux rendements accrus. Nous avons entrepris des démarches en vue d'appliquer ce procédé à des plantes d'intérêt agronomique.

Matériels & Méthodes

Matériels & Méthodes

I. Matériels biologiques

A- Matériel végétal : Présentation des lignées d'*Arabidopsis thaliana*

Les expériences ont été réalisées sur différentes lignées transgéniques issues de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* écotype Columbia (Col-0). La lignée contrôle, utilisée notée *Ctrl* a été obtenue par transformation de plantes sauvages via le vecteur vide pCW162. Cette lignée *Ctrl* permet de s'affranchir des potentielles variations dues à l'insertion de l'ADN-T (ADN de transfert) contenant la cassette de résistance à l'antibiotique kanamycine. Les variations ainsi observées reflèteront seulement la sous/surexpression des gènes d'intérêt.

A mon arrivée au laboratoire, Bertrand Gakière avait obtenu plusieurs lignées surexprimant le gène de la L-aspartate oxydase (AO), sous contrôle du promoteur fort et constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) présent dans le vecteur pCW162. L'ADNc du gène de l'AO est sous-cloné entre les sites de restrictions *Sma*I et *Sal*I du vecteur binaire pCW162, fourni par Marie-Pascale Doutriaux, sous contrôle du promoteur 35S. Les amorces sont données en Annexe 2. Le vecteur pCW162 dérive du vecteur binaire pPZP111 (Hajdukiewicz et al., 1994). Les plantes transformées avec le vecteur pCW162 sont donc résistantes à la kanamycine. La construction comportait une séquence d'adressage plastidial, ce qui permet une surexpression chloroplastique. Plusieurs lignées de transformants ont été sélectionnées sur milieu $\frac{1}{2}$ Murashige et Skoog (MS) additionné de Kalysagar (Kalys SA) supplémenté en kanamycine (Sigma-Aldrich®) à une concentration de 50 mg/mL. Les lignées issues de la génération T5 sont appelées 35S::AO 1 et 35S::AO2.

Les lignées mutantes d'insertion ADN-T pour le gène de la L-Aspartate oxydase (écotype Col-0) (numéro d'accension *At5g14760*) ont été obtenues à partir de la collection SAIL (Syngenta), *Sail_1145_B10* et celle du Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, San Diego, USA (Alonso et al., 2003) : *SALK_013920C*, appelées respectivement *mAO1* et *mAO2*. Les plantes homozygotes pour l'insertion de l'ADN-T ont été isolées par génotypage PCR en utilisant les couples d'amorces

(allèle sauvage) et (allèle muté, séquence de l'ADN-T) (**Annexe 3**). L'ADN-T est positionné dans le dernier exon du gène *At5g14760* pour les deux lignées. Afin de restaurer le phénotype sauvage de la lignée *mAO1*, la complémentation de ce mutant a été entreprise. Le gène complet contenant 1 kb de promoteur a été cloné par Dr. Alexis Kasaras (Freie Universität, Berlin, Allemagne) entre les sites de restriction Xba1 et Spe1 du vecteur pCB302 contenant le gène *BAR* (<http://www.springerlink.com/content/t94w6463mv108155/>) codant une phosphinothricine acétyl-transferase (PAT) et conférant la résistance à l'herbicide Basta® (Bayer® CropScience).

Afin d'assurer une germination synchrone des graines, celles-ci sont semées sur terreau et placées 2 jours à 4°C avant d'être transférées en chambre de culture en jours courts (photopériode : 8 h de lumière à 22°C et 16 h d'obscurité à 19°C) sous intensité lumineuse de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et 65% d'humidité. Les plantules âgées de dix jours sont repiquées en pots individuels. Les expériences sont réalisées sur des plantes âgées de 6-7 semaines. Lors de la récolte, les échantillons sont rapidement congelés dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

B- Conditions de culture des plantes

1- Cultures en pots sur terreau

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont semées sur terreau traité préventivement par imprégnation de Prévicur® (Bayer® CropScience) à 1 mL.L⁻¹ et de Trigard® (Syngenta®) à 0,2 g.L⁻¹ ceci dans le but de prévenir l'apparition de fonte des semis et le développement de sciarides. Afin d'assurer une germination synchrone des graines, le semis est suivi d'une période de stratification à forte humidité et basse température (4°C) pendant deux jours. La germination des plantules est obtenue en chambre de culture en jours courts sous une photopériode de 8 h de lumière à 22°C et 16 h d'obscurité à 19°C, sous intensité lumineuse de 100 $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les premiers jours du passage des semis en chambre de culture se font sous mini serre pour éviter une dessiccation importante du sol. La mini serre est ensuite retirée et l'humidité est régulée à 65%. L'ajout de solution nutritive est réalisé deux fois par semaine (PLANT-PROD : 6,440 kg/23 L, FERTOLIGO® :

100 mL/23 L ; FERTIL selon la procédure Plan Ferti 10). Les plantules âgées de dix jours sont repiquées en pots individuels. Sauf indication contraire, l'échantillonnage est effectué en milieu de photopériode et les échantillons prélevés sont rapidement congelés dans l'azote liquide puis conservés jusqu'aux analyses à -80°C.

2- Cultures hydroponiques d'*Arabidopsis thaliana*

Les lignées ont été cultivées en hydroponie dans une chambre de culture Sanyo. L'intensité lumineuse est $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sous une photopériode de 8 h de lumière à 21°C et 16 h de nuit à 17°C avec une humidité constante de 70% +/- 5%. Avant semis, les graines ont été stérilisées dans une mélange éthanol-barychlor (v/v, 95% / 5%) puis rincées et conservées dans de l'eau stérile à 4°C pendant 4 jours pour stratification. Une graine stérile est ensuite déposée sur chaque microtube de 500 μL coupé à la base contenant la solution nutritive (5mM nitrates) gélifiée dans l'agar 0,7%. Les graines sont ainsi semées sur deux plaques 225 trous mises en contact avec la solution nutritive de culture dans laquelle les racines vont se développer. Les plantes sont cultivées pendant 28 jours et la solution nutritive est remplacée une fois par semaine la première semaine, trois fois par semaine les deuxièmes et troisièmes semaines puis tous les jours la dernière semaine suivant le protocole décrit selon Kiba et al., 2012.

Une partie des plantes va subir divers traitement afin de mesurer les influx de nitrate et de déterminer la vitesse d'absorption du nitrate par les racines. Sur les plantes restantes, les parties aériennes et racinaires sont séparées avant d'être séchées et pesées et congelées dans de l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et pilon. La poudre obtenue est conservée à -80°C pour les différents dosages.

3- Cultures *in vitro*

Les cultures *in vitro* s'effectuent dans une chambre de culture thermorégulée à 23°C sous une photopériode de 8 h et une intensité lumineuse de 200 μmoles de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Avant semis, les graines sont stérilisées durant 5 minutes dans un mélange éthanol (VWR®) : barychlore (Bayrol) (95/5), puis rincées à l'éthanol absolu et séchées sous hotte stérile à flux laminaire. Les graines désinfectées et sèches sont semées à la volée sur milieu $\frac{1}{4}$ -Hoagland's (Hoagland, 1920a) additionné de

Kalysagar (Kalys® SA) et supplémenté de 50 µg.mL⁻¹ de kanamycine monosulfate (Sigma-Aldrich®). La germination des semis est synchronisée par un passage de deux jours à l'obscurité à 4°C, puis le semi est transféré en chambre de culture.

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

C- Souches bactériennes et fongique

1- Agents pathogènes

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (*Pst*) est une bactérie à Gram négatif, hémibiotrophe, et responsable de la maladie de la moucheture sur la tomate et *Arabidopsis*. Deux souches de cette bactérie, fournies par Glazebrook & Ausubel, (1994), ont été utilisées dans ce travail : la souche *Pst* DC3000 (*Pst*) qui est virulente sur *Arabidopsis* Col-0, et la souche DC3000 transformée avec un vecteur portant le gène d'avirulence bactérien *AvrRpm1* (*Pst-AvrRpm1*), qui est avirulente sur Col-0. Ces deux souches possèdent les gènes de sélection pour la résistance à deux antibiotiques : la rifampicine et la kanamycine. Les bactéries sont conservées à -80°C dans du milieu de culture supplémenté à 80% de glycérol.

La souche B05.10 du champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* a été fournie par Marc-Henri Lebrun (Unité BIOGER, INRA, Grignon). *B. cinerea* est l'agent causal de la pourriture grise, maladie touchant plus de 200 espèces végétales. La souche a été régulièrement repiquée sur milieu solide PDB (Potato Dextrose Broth) - agar et mise en croissance à 20°C.

2- Autres souches bactériennes

La souche bactérienne d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) (Koncz & Schell, 1986) contenant le vecteur binaire pBINm-gfp5-ER (Haseloff et al., 1997) a été utilisée pour la transformation stable d'*Arabidopsis thaliana* par technique de « floral dip » (Clough & Bent, 1998). Cette souche est désarmée (en d'autres termes elle ne possède plus ses facteurs de virulence), mais possède une forte capacité

d'infection. En effet, durant la phase d'infection, le fragment d'ADN de transfert (ADN-T) porté sur le plasmide d'infection s'intègre de façon aléatoire dans le génome de la plante. La souche GV3101 possède les gènes de résistance à la gentamycine et la rifampicine. La souche bactérienne d'*Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen®) a également été utilisée. Elle constitue un des hôtes nécessaires aux étapes de clonage des inserts d'ADNc (ou d'ADN génomique dans le cas de la complémentation du mutant mAO Sail_1145_B10) depuis le plasmide binaire pCW162.

II. Obtention des lignées transgéniques

A- Transformation d'*Arabidopsis thaliana* par Agrobactéries

La transformation des plantes d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisée par trempage des boutons floraux par la méthode de « *floral dip* » (Clough & Bent, 1998).

B- Sélections des plantes transformées

1- Sélection sur kanamycine

Les graines issues des transformants 35S::AO sont récoltées puis conservées à l'obscurité à 4°C. Elles sont stérilisées selon le protocole décrit précédemment puis semées à la volée sur milieu sélectif ($\frac{1}{2}$ MS, Kalysagar) contenant 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de kanamycine monosulfate. Après environ 10 jours en chambre de culture *in vitro* (23°C, sous intensité lumineuse de 200 $\mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), les plants résistants sont transférés sur pot de terreau en chambre de culture en jours longs (photopériode 16 h) afin d'obtenir des graines qui subiront un nouveau régime de sélection. Le nombre des plantes transgéniques putatives est noté pour sélectionner les lignées qui ont inséré une seule copie du transgène (rapport $\frac{3}{4}$ non résistants, $\frac{1}{4}$ résistants). Les descendants sont sélectionnés jusqu'à obtention de lignées stables homozygotes pour l'insertion ADN-T. Deux lignées indépendantes ont été sélectionnées (35S::AO1 et 35S::AO2) sur la base du niveau d'expression du gène AO analysé par qPCR et des teneurs en NAD des lignées.

1- Sélection sur Basta®

Les transformants issus de la transformation du mutant Sail_1145_B10 sont sélectionnés sur terreau par pulvérisation de solution Basta® (Bayer® CropScience)

à une concentration de 1,25 mL.L⁻¹. Le Basta® contient l'herbicide glufosinate. L'opération est répétée deux fois avec 3 à 4 jours d'intervalle. Les plantes résistantes sont ensuite transférées en pot jusqu'à obtention de graines.

III. Techniques d'études moléculaires

A- Amorces oligo-nucléotidiques utilisées dans ce travail

Les différentes amorces PCR de génotypage, de clonage et RT-qPCR sont listées dans l'**Annexe 3**. Les amorces LBSAIL et Lbb1.3 correspondent aux amorces des ADN-T des lignées *mAO1* et *mAO2* respectivement.

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

1- Extraction d'ADN génomique à partir d'échantillon foliaire

Pour chaque plantule, une feuille est broyée au broyeur à billes (Retsch® MM300) (3 x 30 s à 30 Hz) puis sont ajoutés 400 µL de tampon d'extraction Edwards (Tris 1M pH 7,5, NaCl 4 M, EDTA 0,5 M, SDS 20%). Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 4°C. Ensuite 200 µL de surnageant sont prélevés et mélangés à 200 µL d'isopropanol (VWR) qui précipite l'ADN. Après une seconde centrifugation de 10 min à température ambiante, le culot contenant l'ADN est débarrassé du surnageant et nettoyé avec 1 mL d'éthanol à 70%. Une centrifugation brève permet de retirer le reste d'éthanol, puis les tubes sont mis à sécher 5 minutes sur la paillasse. Les ADN ainsi extraits sont alors re-suspendus dans 100 µL de TE (Tris 10 mM pH 7,9 EDTA 1 mM) et conservés à 4°C (d'après Weigel & Glazebrook, 2002).

2- Amplification par PCR

La PCR est réalisée sur chaque échantillon d'ADN de plante afin de tester la présence ou non de l'ADN-T dans le gène d'intérêt. L'ADN de chaque échantillon est ainsi amplifié en utilisant un couple d'amorce données en **Annexe 3**. Une PCR vise à amplifier un fragment du gène sauvage et une autre PCR à amplifier un fragment du gène sauvage disrupté par l'ADN-T. Chaque mélange pour PCR contient 1 U de Go Taq polymérase (Promega®), 1X de tampon pour Go-Taq (Tris-HCl 250 mM, pH

9, NaCl 250 mM), 0.25mM de dNTP, 5 mM de MgCl₂ qsp 25 µL d'eau. Pour amplifier le gène sauvage, les deux amorces à 10 mM du gène sauvage à amplifier sont ajoutées en quantité (de 1 µL) équivalente. Pour amplifier le gène muté contenant l'ADN-T, on ajoute un type d'amorce complémentaire à une partie de l'ADN-T, et un autre type d'amorce complémentaire à l'une des bornes du gène sauvage de sorte que ces deux amorces soient antiparallèles. Les 25 µL de mélange réactionnel sont soumis à 25 cycles de réaction PCR durant 90 min et suivant le programme : 30 s à 94°C, 30 s à 58°C et 1min à 72°C.

3- Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN linéaires est obtenue par migration électrophorétique dans un gel horizontal contenant 1% (P/V) d'agarose. Le tampon TAE de migration est composé de Tris-acétate 40 mM et EDTA 1 mM (pH 8,3). La migration s'effectue sous une tension comprise entre 80 et 150 V. Après migration, les fragments d'ADN ayant fixé le bromure d'éthidium (BET) sont visualisés sous lumière ultraviolette (UV).

4- Transformation des Agrobactéries par électroporation

Cette technique permet d'introduire un ADN plasmidique dans une cellule hôte bactérienne par un choc électrique (Dower et al., 1988). Elle a été utilisée pour la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Pour la préparation des bactéries électrocompétentes, 500 mL de milieu LB sontensemencés avec une pré-culture de la nuit et la croissance a lieu jusqu'à une DO de 0,8 à 600 nm. La culture est laissée 10 min sur la glace, puis centrifugée à 4°C, 15 min à 3000g. Le culot obtenu est lavé deux fois avec 500 mL d'eau stérile (afin d'éliminer les sels qui pourraient diminuer la résistance électrique du milieu), puis repris dans 8 mL de glycérol stérile 10% à 4°C. Des aliquotes de 100 µL sont congelées dans de l'azote liquide. Environ 50 ng du plasmide transformant issu d'une préparation plasmidique sont placés sur une aliquote de bactéries électrocompétentes dans lesquelles le plasmide pénètre grâce à un choc électrique très bref, mais de forte intensité (appareil Bio-Rad Gene Pulser, 15 kV.cm⁻¹, 25 µF, 200 Ω, Hercules, USA). Après l'impulsion électrique, 1 mL de

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

5- Séquençage des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN ont été séquencés sur les deux brins par la société MWG-Biotech. Les amplicons PCR et la construction obtenue à partir du vecteur pCW162 et de l'ADNc de l'AO, conjointement avec Dr. Bertrand Gakière, ainsi que la construction de complémentation du mutant Sail_1145_B10 obtenue grâce à Dr. Alexis Kasaras, ont été séquencés afin de vérifier l'intégrité des séquences.

IV. Etude des niveaux de transcrits de gènes d'intérêt par RT-qPCR

A- Extraction et dosage d'ARN

Environ 80 mg de feuilles sont broyées en poudre fine au broyeur à billes (3 x 30 s à 30 Hz, type Retsch MM300). Un mL de TriReagent (Molecular Research Center, Euromedex) est ajouté et le mélange est vortexé jusqu'à complète homogénéisation. Après incubation 5 min dans un bain-marie à 30°C, 200 µL de chloroforme sont ajoutés, puis l'extrait est centrifugé 15 min à 10000g à 4°C. La phase supérieure est transférée dans un tube autoclavé et un demi-volume d'isopropanol est ajouté afin de permettre la précipitation des ARN. Après plusieurs inversions du tube, les extraits sont incubés à température ambiante 20 min puis centrifugés 15 min à 10000g à 4°C. Après élimination du surnageant, 1 mL d'éthanol 70% est ajouté afin d'enlever les sels résiduels. Après vortex, les échantillons sont centrifugés 15 min à 6000g à 4°C. L'éthanol est ensuite retiré et les culots sont laissés à sécher. Une fois les culots complètement secs, 20 µL d'eau stérile à 55°C sont ajoutés et laissés incubés 10 min à 55°C. Les culots sont re-suspendus par pipetage. Les ARNs sont ensuite dosés par spectrophotométrie à 260 et 280 nm par un Nanodrop (type ND1000) et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

A la suite de l'extraction d'ARN, un traitement à la DNase est nécessaire afin de s'affranchir des résidus d'ADN. Le kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega) a été utilisé. Deux µL d'ARN à 1µg.µL⁻¹ sont ajoutés 1X de RQ1 RNase-Free DNase

reaction buffer ; 1 U de RQ1 RNase-Free DNase (1 U. μg^{-1} RNA) et le volume est complété à 10 μL avec de l'eau nuclease-free. Après incubation 30 min à 37°C, 1 μL de RQ1 Dnase Stop solution est ajouté pour terminer la réaction. Puis les ARN sont incubés 10 min à 65°C afin d'inactiver la DNase. Puis, les ARN sont à nouveaux dosés et conservés à -80°C.

B- Synthèse des ADN complémentaires par transcription inverse

La réaction de rétro-transcription des ARNm en ADNc a été réalisée à partir de 1 μg d'ARN de chaque échantillon. 50 nmoles oligo dT ont tout d'abord été hybridés à la queue poly A des ARNm à 70°C pendant cinq minutes (Promega). La réaction a été arrêtée en plaçant les échantillons à 4°C. La rétro-transcription a ensuite été réalisée pendant une heure à 42°C en présence d'1 U d'enzyme de RT et des réactifs du kit ImpromII® (Promega). La réaction de PCR a été réalisée sur 8 μL d'ADNc dilués à 10 $\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$ dans de l'eau stérile, avec des amorces permettant d'amplifier de manière spécifique des fragments de taille comprise entre 100 et 200 pb et une T_m de 60°C).

C- PCR quantitative (qPCR)

1- Conception des amorces RT-qPCR

Les séquences des gènes ont été obtenues sur le site du TAIR (The *Arabidopsis thaliana* Information Resource, [http://www.Arabidopsis thaliana.org/](http://www.Arabidopsis_thaliana.org/)). Les amorces sont listées en **Annexe 4**. Les produits d'amplifications comportent de 50 à 150 pb ; les amorces ne doivent ni s'hybrider entre elles ni former de structures secondaires ; la proportion en GC doit être comprise entre 40 et 60% ; le nombre de G ou C successifs ne doit pas dépasser pas 4 ; les 5 nucléotides en 3' doivent être 3 G/C au maximum ; la T_m , calculée à l'aide du logiciel en ligne Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>), doit être comprise entre 58°C et 60°C. La spécificité des séquences est vérifiée par un blast sur le génome sur le site du TAIR. Les amorces ont été synthétisées par les sociétés MWG-Biotec et Eurogentec. Les solutions stock sont préparées à 100 μM dans de l'eau stérile « nucleic acid free » et stockées à -20°C. Les solutions utilisées pour la réaction de qPCR sont préparées à 10 μM .

2- PCR quantitative

Les RT-PCR quantitatives sont réalisées sur des plaques 96 puits dans le thermocycleur LightCycler 480® avec le kit LightCycler 480 SYBR Green I Master de Roche (Meylan, France). Les réactions sont réalisées avec 10 ng de matrice et 250 nM de chaque amorce qPCR (**Annexe 4**), dans un volume final de 10 µL. Les étapes sont une dénaturation à 95°C pendant 5 min, suivie de 40 cycles: 95°C pendant 5 s, 56°C pendant 15 s, et 72°C pendant 20 s. L'élongation est terminée par une étape de 15 s à 95°C. A la fin de l'amplification, une dénaturation est effectuée par un chauffage de 60 à 95°C, qui permet de vérifier la spécificité de l'amplification. La quantification relative, calculée par dérivées secondes, en utilisant l'*ACTINE2* comme référence, est réalisée par le logiciel LightCycler® 480 Software (Roche® Applied Science).

V. Techniques d'études des protéines

A- Extraction des fractions solubles aqueuses foliaires

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

B- Dosage des protéines totales

1- Dosage à 280 nm

Le dosage des protéines totales solubles permet de calculer les activités spécifiques exprimées en quantité de produit formé par unité de temps (minute) et par quantité de matière initiale (mg de protéines totales). L'absorption maximale des acides aminés aromatiques se situe au voisinage de 280 nm. La détection par spectrophotométrie à cette longueur d'onde évalue la quantité de protéines totales d'un extrait. Une unité d'absorption à 280 nm correspond à une concentration approximative en protéines de 1 mg.mL⁻¹.

2- Dosage selon la méthode dite de Bradford

Cette quantification des protéines totales est basée sur la modification de la longueur d'onde maximale d'absorption du bleu de Coomassie G 250 une fois fixé sur les protéines (de 460 à 595 nm; Dahmen et al., 1967). La quantification des protéines est réalisée par référence à une gamme étalon de sérum albumine bovine.

C- Mesure de l'activité nitrate réductase (NR)

1- Extraction

Environ 500 mg de feuilles sont broyées au mortier dans l'azote liquide en présence de 10 mg de sable de Fontainebleau, puis resuspendus dans 1,4 mL de tampon d'extraction A (HEPES 50mM pH 7,6, Triton X-100 0,1%, Leupeptine 10,8 μ M, PMSF 100 μ M, FAD 19,2 μ M, DTT 2,9mM, PVP 1%, MgCl₂ 5 mM). Le broyat est transféré dans un tube de 1,5mL puis clarifié par 10 min de centrifugation à vitesse maximale (14000g) à 4°C. L'activité NR est dosée sur le surnageant dessalé sur colonne NAP-5 dans un nouveau tube et homogénéisé. La concentration en protéines totales est réalisée sur une aliquote du surnageant.

2- Mesure de l'activité extractible

La NR réduit les nitrates en nitrites qui peuvent se complexer avec le N-1-Naphtyléthylène diamine (NNED) en milieu acide et développer une coloration rose. Deux dosages d'activité sont réalisés : l'activité NR endogène en présence de MgCl₂ (apport de Mg²⁺) qui favorise la complexation de la NR phosphorylée avec une protéine 14-3-3 inhibitrice et l'activité NR maximale potentielle *in vitro* en présence d'EDTA. L'EDTA permet de chélater les cations bivalents et donc de dissocier le complexe 14-3-3/NR. La mesure de l'activité en présence de Mg²⁺ représente l'état d'activation de l'enzyme, encore appelée phosphorylation apparente, par rapport à l'activité maximale potentielle. Cette activité est exprimée en μ moles de nitrites formés par heure et par mg de protéines solubles. Le milieu réactionnel est constitué d'un tampon HEPES 50 mM pH 7,6, BSA 0,5 % (P/V) dans 350 μ L finaux avec 50 μ L d'extrait, 50 μ L de KNO₃ à 100 mM. Pour mesurer l'activité endogène, 7,5 μ L de MgCl₂ à 0,5 M sont ajoutés, et pour l'activité maximale potentielle, 7,5 μ L d'EDTA à 148 mM. Le volume final est ajusté à 350 μ L finaux avec le tampon B [soit 250 μ L pour le blanc et 242,5 μ L pour l'activité endogène et maximale]. Le blanc réactionnel

contient en plus 50 μL de ZnSO_4 à 0,5 M. Ce mélange réactionnel est préincubé pendant 2 minutes à 30°C , puis la réaction est initiée par ajout de 50 μL de NADH à 2 mM. Après agitation, l'incubation est réalisée pendant 30 min. Toutes les 5 min, 50 μL de ZnSO_4 à 1 M sont ajoutés pour stopper la réaction, ainsi que 500 μL de sulfanilamide à 1,5 % (dans HCl 1,5 N). Les nitrites sont ensuite révélés par coloration avec 500 μL de solution aqueuse NNED à 0,02 % et le tube est vortexé. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'échantillon est clarifié par centrifugation pendant 5 min à vitesse maximale. L'absorbance est mesurée sur le surnageant à 540 nm contre le blanc. Le dosage des nitrites est réalisé en référence à une gamme étalon réalisée à partir d'une solution de NaNO_2 à $100 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$.

D- Dosage de l'activité Rubisco

Cinq cents mg de feuilles sont prélevés, broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et pilon et extraits avec 1 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 8, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT et 0,2 mM PMSF. Puis l'extrait est centrifugé à 4°C , 8000g, 1 min. Le surnageant est dessalé sur des colonnes NAP-5 (GE-Healthcare). L'activité totale de la rubisco a été déterminée à partir du taux d'incorporation de $^{14}\text{CO}_2$ dans les composés acides stables et après comptage par scintillation du ^{14}C , comme décrit précédemment (Sharkey et al., 1986). Pour commencer la réaction, à 40 μL d'extrait de plante dessalé sont ajoutés 60 μL de tampon de réaction (Tris-HCl 0,1 M pH 8, MgCl_2 10 mM), 10 μL de RuBP 2 mM, 10 μL $\text{NaH} [^{14}\text{C}]\text{O}_3$ 20 mM (Perkin-Elmer) et incubées 10 min à 30°C . La réaction est arrêtée avec du HCl 6N. Après évaporation du bicarbonate non incorporé à 80°C , la radioactivité a été déterminée par comptage de scintillation.

E- Dosage de l'activité phosphoénol pyruvate carboxylase (PEPc)

Le dosage de l'activité PEPc se fait de façon similaire à celui de l'activité rubisco avec un changement de composition du tampon de réaction : Tris-HCl 0,1 mM, MgCl_2 10 mM, 10 μL PEP, 10 μL NADH 1 mM, 0,1 U malate déshydrogénase, 10 μL $\text{NaH} [^{14}\text{C}]\text{O}_3$ 20mM. La réaction est arrêtée avec du HCl 6N. Après évaporation du bicarbonate non incorporé à 80°C , la radioactivité a été déterminée par comptage de scintillation.

F- Mise au point du dosage de l'activité L-aspartate oxydase

Une méthode de dosage de l'activité de la L-aspartate-oxydase a été développée en utilisant un spectrophotomètre : 0,5 g d'échantillon de feuilles congelées a été broyé dans l'azote liquide, et repris dans 2 mL de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 8). Après centrifugation, l'extrait brut a été dessalé par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne PD-10. Pour 0,7 ml de l'extrait dessalé, 100 µL de L- aspartate 10 mM, 100 µL de fumarate 10 mM et 100 µL de FAD 200 µM ont été ajoutés pour démarrer la réaction, qui a été suivie à 30°C pendant 30 min. La réaction a été arrêtée par chauffage à 100°C 2 min pour précipiter les protéines, suivi d'une centrifugation. A 1 mL de surnageant réactionnel ont été ajoutés successivement : 0,5 mL de phénolate de sodium 0,33 M pH 13 ; 0,5 mL de nitroprussiate de sodium 0,1% ; 0,5 mL NaClO 0,2%.

L'activité L-aspartate-oxydase a été mesurée en spectrophotométrie à DO 635 nm par dosage, contre une gamme étalon de 0 à 100 nmoles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, du NH_4^+ provenant de la dégradation quasi instantanée à pH 8 de l'iminoaspartate formé au cours de la réaction.

VI. Techniques d'études métabolomiques

A- Dosage du pool d'antioxydants cellulaires.

Les dosages de métabolites aux propriétés antioxydantes comme les nucléotides à pyridine, le glutathion et l'ascorbate sont réalisés par spectrophotométrie *via* un couplage enzymatique (**Figure 92**). L'utilisation d'un lecteur de microplaque (type Multiskan spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) permet de réaliser sur un seul extrait simultanément toute une batterie de dosages d'antioxydants (NAD, NADP, GSH, GSSG, ascorbate réduit et total, phéophytines) avec un seuil de détection en dessous de la picomole. Tous les réactifs ont été fournis par la société Sigma-Aldrich®. D'après Queval and Noctor, 2007.

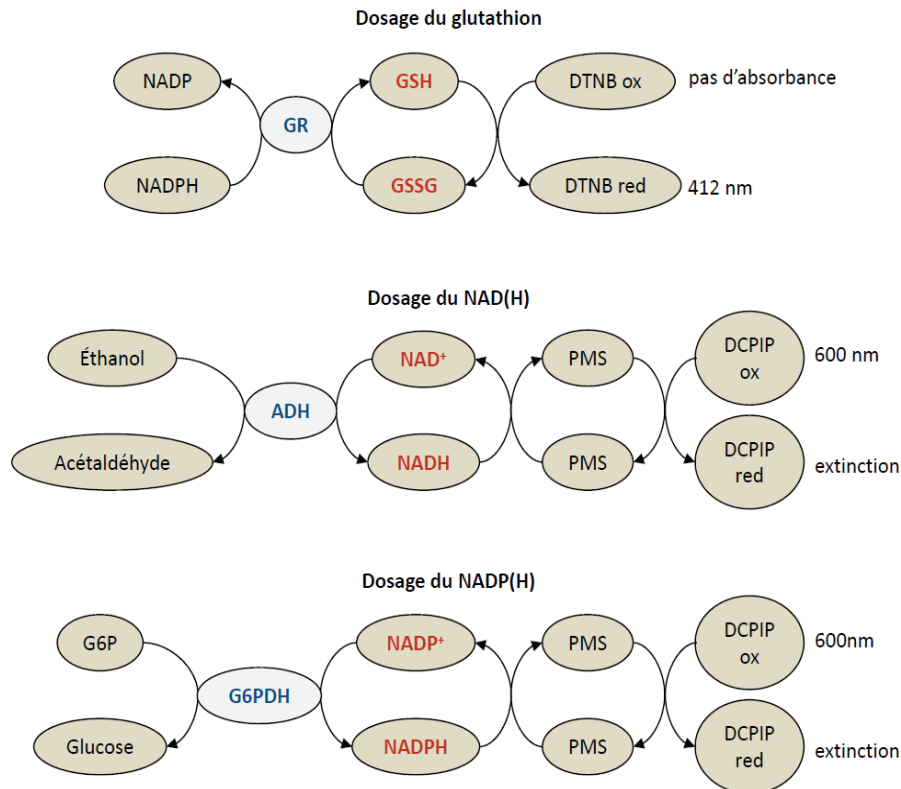


Figure 92. Principes des dosages colorimétriques des antioxydants libres cellulaires (glutathion, du NAD(H) et du NADP(H)). ADH ; alcool déshydrogénase ; DCPIP ; 2,6-dichlorophénol-indophénol, G6P ; glucose 6-phosphate ; G6PDH, glucose 6-phosphate déshydrogénase, GR ; glutathion réductase, PMS ; phénazine méthosulfate, ox ; forme oxydée, red ; forme réduite.

1- Extraction acide

Environ 100 mg de feuilles sont broyées au mortier dans l'azote liquide, auxquels 1 mL de HCl 0,2 N est ajouté. Après décongélation du broyat, celui-ci est transféré dans un tube de 2 mL et 50 μ L sont prélevés pour le dosage des phéophytines. L'extrait est ensuite clarifié par centrifugation pendant 10 min à 14000g, à 4°C. Le surnageant est séparé en deux aliquotes : l'une servant au dosage du glutathion, l'autre au dosage du NAD(P). Dans un premier tube, 500 μ L de surnageant sont neutralisés en ajoutant 50 μ L de NaH₂PO₄ 200 mM pH 5,6 et un volume suffisant de NaOH 0,2 M (environ 400 μ L) pour atteindre un pH 5 - 6. Le volume exact rajouté est noté. Dans un deuxième tube, 200 μ L de surnageant sont chauffés pendant 1 min à 100 °C, puis neutralisés en ajoutant 20 μ L de NaH₂PO₄ 200 mM pH 5,6 et un volume suffisant de NaOH 0,2 M (environ 200 μ L) pour atteindre un pH 7. Ce deuxième tube sert à la quantification du NAD(P). Le premier

tube permettra de doser les autres antioxydants cellulaires cités ci-dessus. Pour chaque échantillon, les deux tubes sont précautionneusement gardés dans la glace.

2- Extraction alcaline

Pour le dosage des formes réduites NADH et NADPH, une extraction alcaline est nécessaire. De la même manière que pour l'extraction acide, 100 mg de feuilles sont broyées au mortier dans l'azote liquide puis 1 mL de NaOH 0,2 M est ajouté. Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 14000g à 4°C. Deux cents µL de surnageant sont chauffés pendant 1 min à 100°C, puis neutralisés en ajoutant 20 µL de NaH₂PO₄ 200 mM pH 5,6 et un volume suffisant de HCl 0,2 N (environ 150 µL) pour atteindre un pH 7.

3- Dosage des chlorophylles

Les chlorophylles extraites dans l'acide sont dégradées et libèrent leur atome de Mg pour former des phéophytines qui peuvent être quantifiées. Cinquante µL d'extrait non centrifugés sont mélangés à 1,2mL d'acétone 80% V/V. Les tubes sont mis à reposer pendant 2 h à 4°C à l'obscurité, puis centrifugés 10 min à 14000g. L'absorbance (DO) est ensuite lue à 666 et 655 nm. La concentration en phéophytines dans la cuve (en µg.mL⁻¹) est ensuite estimée par la formule suivante : $(6,75 \times DO_{666}) + (26,03 \times DO_{655})$, en tenant compte du facteur de dilution.

La teneur en chlorophylles totales a également été déterminée à l'aide d'un chlorophylle-mètre (SPAD-502, KONIKA MINOLTA®) sur des feuilles individuelles matures de plantes. Pour chaque essai, 4 feuilles par plante et 10 plantes par écotype ont été échantillonnées. La mesure qui caractérise une feuille est en fait la moyenne de 4 mesures effectuées sur différentes parties de son limbe. Deux expériences indépendantes ont été réalisées par génotype, *in fine*, 160 mesures de chlorophylles par génotype (10 plantes x 4 feuilles x 2 mesures par feuilles x 2 essais) sont disponibles.

4- Dosage des nucléotides à pyridine

a) NAD⁺ et NADH

Les formes « oxydée » et « réduite » sont séparées respectivement par extraction acide ou alcaline. Ces deux formes sont quantifiées par une réaction de recyclage en suivant la réduction du DCPIP (2,6-dichlorophénol-indophénol) à 600 nm en présence d'alcool déshydrogénase (ADH, Sigma-Aldrich®) et d'éthanol (**Figure 91**). Sur une plaque de 96 puits, la première ligne est utilisée pour quatre points d'une gamme standard de NAD⁺ ou NADH, le reste pour le dosage des échantillons. Chaque échantillon ou standard est réalisé en triplicatas. Dans chaque puits, sont ajoutés dans cet ordre 100 µL de tampon HEPES 100 mM/EDTA 2 mM pH 7,5, 20 µL de DCPIP 1,2 mM, 10 µL de PMS (phénazine méthosulfate) 10 mM et 10 µL d'ADH (25 U) dans un volume final de 200 µL. Le NAD⁺ ou NADP⁺ est ajouté à la gamme standard. Pour les échantillons à tester, 20 µL d'extrait et 25 µL d'eau bidistillée sont ajoutés. Après agitation de la plaque, la réaction est initiée par ajout de 15 µL d'éthanol absolu. Les mesures de NAD sont réalisées à 600 nm par le lecteur de microplaque Multiskan Spectrophotometer et le logiciel Multiskan Lab (Thermo Fisher Scientific). La quantification du NAD(H) est effectuée par référence à la gamme étalon.

b) NADP⁺ et NADPH

Un dosage par couplage enzymatique peut également être utilisé pour doser les formes réduites et oxydées du NADP. La réaction de recyclage se base sur la réduction du DCPIP à 600 nm en présence de deux unités de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6DPH, Roche Applied Science®) et de glucose-6-phosphate (G6P) (**Figure 91**). Sont mélangés 20 µL d'extrait à 100 µL de tampon HEPES 100 mM/EDTA 2 mM pH 7,5, 20 µL de DCPIP 1,2 mM, 10 µL de PMS 20 mM dans un volume final de 200 µL. La réaction est amorcée par l'ajout de 10 µL de G6P 10 mM et suivie à 600 nm et 25°C pendant 5 min. La concentration en NADP(H) est calculée à partir de standards mesurés de la même façon.

5- Dosage du glutathion

Les formes réduite (GSH) et oxydée (GSSG) du glutathion sont dosées par une réaction de recyclage en suivant la réduction du DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate ou réactif d'Ellman, Sigma-Aldrich®) à 412 nm par le glutathion en

présence de glutathion réductase (GR, Roche Applied Science) et de NADPH (Queval & Noctor, 2007) (Figure 44). Dix μL d'extrait sont mélangés à du NaH_2PO_4 100 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, DTNB 0,6mM, NADPH 0,5mM dans un volume final de 200 μL . La réaction est initiée par l'ajout de 0,2 U de GR et suivie à 412 nm et 25°C pendant 5 min. La concentration en glutathion est calculée à partir de standards de GSH. Le même dosage par couplage enzymatique permet de doser le GSSG sur 20 μL d'extrait. Sont d'abord incubés 200 μL d'extrait en présence de 2 μL de 2-vinylpyridine pendant 30 min à température ambiante, puis deux centrifugations successives sont effectuées pendant 15 min chacune à 14000g à 4°C. Les standards de GSSG sont traités de la même manière que les extraits.

B- Mesure des ions nitrates

Cent mg de feuilles sont broyées dans l'azote liquide au broyeur à billes et extraits avec 1 mL d'HCl 100 mM en présence de PVP insoluble. Les extraits sont centrifugés 5 min à 10000g à 4°C. Les surnageants sont utilisés pour déterminer les contenus en nitrates et ammonium. Les nitrates sont dosés en utilisant le protocole décrit par (Cataldo et al., 1975). Dix μL d'échantillon sont ajoutés à 40 μL d'acide salicylique 5% (v/v) préparé dans de l'acide sulfurique concentré et incubés 20 min à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout de 950 μL de NaOH (2N) et après total refroidissement la DO est mesurée à 410 nm. La quantité d'ions nitrates est déterminée par rapport à une gamme étalon de 0 à 100 nm de KNO_3 .

C- Mesure des ions ammonium

A 50 μL de surnageant réactionnel ont été ajoutés successivement 0,5 mL de phénolate de sodium 0,33 M pH 13, 0,5 mL de nitroprussiate de sodium 0,1%, 0,5 mL NaClO 0,2%. La réaction se déroule 40 min à température ambiante puis l'absorbance est mesurée contre le blanc constitué du mélange des réactifs sans échantillons. Le calcul de la teneur en ammonium s'effectue par comparaison à une gamme étalon variant de 0 à 100 nmoles de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ d'après Gordon et al., (1978) .

D- Dosage du glucose

Environ 100 mg de feuilles sont prélevés et extraits avec 1 mL de HClO₄ 1 M et centrifugés 5 min 10000g à 4°C. A 500 µl de surnageant sont ajoutés 200 µL de tampon tris 0,5M pH7,5. Après ajustement du pH à 7 avec une solution de K₂CO₃ 5M, les échantillons sont centrifugés 5 min à 10000g à 4°C. Le surnageant sera utilisé pour le dosage des sucres et le culot sera conservé à -20°C pour le dosage de l'amidon. Les extractions sont réalisées en utilisant le kit saccharose/D-glucose/D-fructose 0716260 (Roche, Boehringer-Mannheim). L'oxydation du glucose permet la formation de NADPH obtenue après une cascade de réactions enzymatiques impliquant une hexokinase et une glucose-6 phosphate déshydrogénase et est quantifié par spectrophotométrie à 340 nm. La quantité de NADPH formée est proportionnelle à celle du sucre soluble dosé. Le glucose est dosé en utilisant une gamme de glucose de 0 à 100 nmoles.

E- Dosage de l'amidon

De la même manière, la teneur en amidon des échantillons foliaires est mesurée et exprimée en équivalent glucose. L'amidon est extrait des culots des extraits hydro-alcooliques puis hydrolysé par une amylase thermostable en maltose et D-glucose puis le maltose est hydrolysé en D-glucose par une α -amyloglucosidase. Le glucose formé par hydrolyse de l'amidon est mesuré de la même façon que précédemment en utilisant une gamme étalon de glucose.

F- Dosage des acides aminés par technique HPLC

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

1- Extraction méthanolique des métabolites

Environ 100 mg de feuilles sont broyées au mortier dans l'azote liquide. Après obtention d'une fine poudre, 1 mL de méthanol 80% et 1 mL d'acide α -OPA β -

mercaptoéthanol acide aminé dérivé OPA - acide aminé aminobutyrique (α -ABA) 0,2 mM sont ajoutés. L' α -ABA constitue le premier étalon interne. Après mélange, le broyat est transféré dans un tube de 2 mL et clarifié par 15 min de centrifugation à 14000g à 4°C. 1,5 mL de surnageant sont récupérés et 75 μ L de ribitol 2 mM sont ajoutés (second étalon). Après une nouvelle centrifugation de 15 min à 14000g à 4°C, le surnageant est aliquoté en 3 fois 0,2 mL et 1 fois 0,4 mL. Les différentes aliquotes sont séchées au speed-vacuum toute une nuit.

2- Quantification absolue des acides aminés en HPLC

Pour faciliter la détection de petites molécules comme les acides aminés, les analystes et biologistes ont développé des techniques chimiques basées sur la dérivation des métabolites à analyser suivie d'une séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La réaction des acides aminés avec l'O-phthaldialdéhyde (OPA) en présence de β -mercaptoéthanol (Lindroth & Mopper, 1979) produit un dérivé fluorophore OPA-acide aminé (**Figure 93**) qui émet une fluorescence détectable par un fluorimètre en sortie de chromatographie ($\lambda_{em} = 360$ nm, $\lambda_{ex} = 450$ nm).

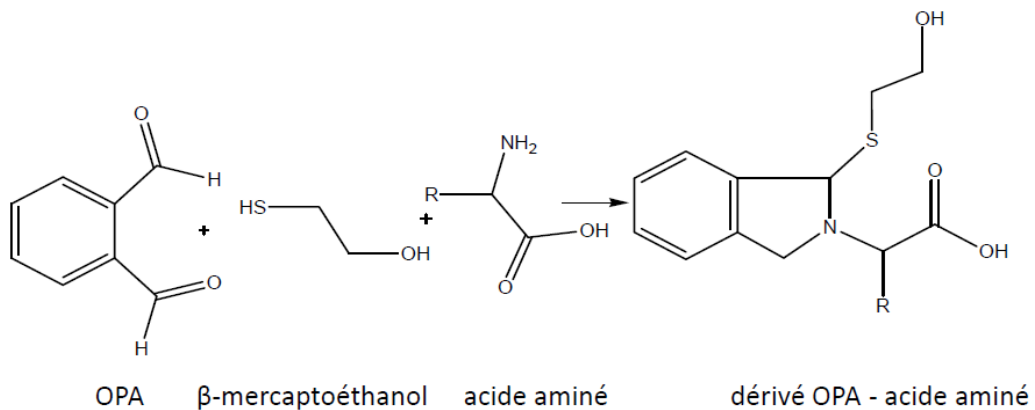


Figure 93. Dérivation des acides aminés à l'O-phthaldialdéhyde (OPA). En présence de β -mercaptoéthanol les acides aminés traités à l'OPA produisent des dérivés fluorophores OPA – acides aminés détectable en fluorimétrie ($\lambda_{em} = 360$ nm, $\lambda_{ex} = 450$ nm).

a) Dérivatisation des échantillons

L'OPA est préparé dans du méthanol (environ 15 mg d'OPA solubilisés dans 200 µL de méthanol). Sont ensuite ajoutés 1,8 mL de tampon borate de sodium 0,5 M, pH 9,5 et 40 µL de β-mercaptoéthanol. Le mélange est alors filtré à l'aide d'une seringue luer-lock 1mL et d'un microfiltre Minisart RC4 dans un vial (12 x 32 mm, Waters®).

b) Conditions chromatographiques

La phase mobile utilisée pour la séparation des acides aminés est composée de deux tampons d'élutions, tampon A : méthanol/acétate de sodium 50 mM, pH 5,9 20/80 (V/V), 1 % de tétrahydrofurane (THF) (V/V) et tampon B : méthanol/acétate de sodium 50 mM, pH 5,9 80/20 (V/V). Une fois préparés, les tampons sont filtrés (filtres type GSWP 0,22µm pour solvant aqueux et GVHP 0,22 µm pour solvant organique, Millipore®) à l'aide d'une pompe à vide. La colonne utilisée est une colonne phase inverse C18 (Symmetry C18 3.5µm, 4.6 x 150mm, Waters®, Guyancourt, France) thermo-régulée à 40°C. L'HPLC utilisée est une Alliance® de chez Waters® (module de séparation 2695 et fluorimètre 2475).

c) Préparation des solutions d'acides aminés standards

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

d) Préparation des échantillons

Une aliquote de 0,2 mL issue de l'extraction méthanolique pour chaque échantillon est resuspendue dans 0,3 mL d'eau bidistillée, puis filtrée à l'aide d'une seringue de microinjection (Luer Lock, Phenomenex) de 1 mL terminée par un microfiltre Minisart RC4 (Sartorius Stedim Biotech). Le filtrat est transféré dans un vial (12 x 32 mm, Waters®).

e) Conditions d'injection des standards et échantillons

L'injecteur prélève 10 µL de standard ou d'échantillon puis 10 µL d'OPA. Après une incubation de 2 minutes dans la boucle d'injection, l'injection démarre. La séparation des dérivés (40 °C, 0,8 mL.min⁻¹) s'effectue selon le gradient : 0-1 min, 0 % B ; 6-11 min, 14 % B ; 16-20 min, 50 % B ; 32-36 min, 100 % B et 37-42 min, 0 % B. Le logiciel utilisé pour les analyses est Empower™ (Waters®).

G- Profilage métabolique par technique GCMS

1- Extraction méthanolique des métabolites

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

2- Préparation du réactif de méthyoxymation et du mélange d'alcane

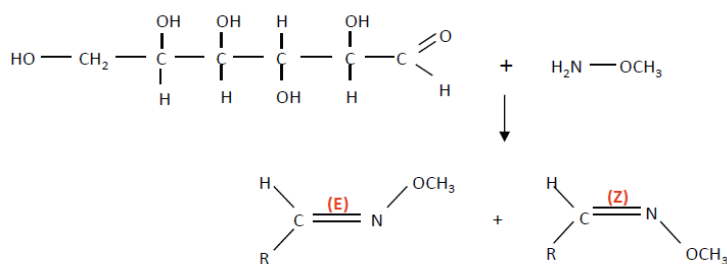
La méthyoxymation est une technique de dérivation qui empêche les échantillons de former des énols instables. Une solution de méthyoxamine (Sigma-Aldrich®) à 20 mg.mL⁻¹ est préparée dans de la pyridine (Sigma-Aldrich®). La solution peut être conservée pendant deux semaines à température ambiante. Une solution d'alcane est nécessaire pour le calcul des indices de rétention des composés qui sont élués en GC. Ils permettent une meilleure identification chromatographique par comparaison avec des bases de données. Les alcanes utilisés sont les suivants : décane, pentadécane, octadécane, nonadécane, docosane, octacosane, doxtriacontane et hexatriacontane (Fluka™). Un mélange d'alcane à 7 mM pour le décane et 1,4 mM pour chaque autre alcane est préparé.

a) Double dérivation des échantillons

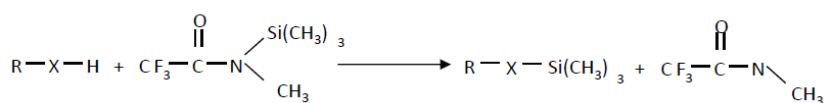
Deux dérivations successives sont réalisées sur les échantillons (**Figure 94**). La méthyoxymation consiste à réduire le groupement carbonyle et éviter la formation de sucres sous forme cyclique. Cette réaction donne lieu à la formation de stéréoisomères (isomères trans (E) et cis (Z)). En silylation, les protons labiles sont remplacés par un groupe alkylsilyl tel que le triméthylsilyl, noté TMS. Cette technique permet ainsi d'abaisser la température d'ébullition en éliminant des groupes polaires

tels que COOH, OH, NH₂, SH, etc. Les dérivés obtenus sont moins polaires donc plus volatiles, ce qui facilite leurs analyses en GC. Pour chaque échantillon (une aliquote de 0,2 mL), 50 µL de solution de méthoxyamine sont ajoutés. L'échantillon est vortexé puis incubé pendant 90 min à 30°C sous agitation. Quarante vingt µL de N-méthyl-N-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide (MSTFA) (Sigma-Aldrich®) sont ajoutés et laissés 30 min à 37 °C sous agitation constante. Une incubation de 2 h à température ambiante est ensuite réalisée. Moins de 20 min avant l'injection, l'échantillon est transféré dans un vial (12 x 32 mm, Agilent) contenant un insert (150 µL, 5 x 28 mm, Agilent) auquel 10 µL de la solution d'alcane sont ajoutés.

La méthoxylation



La silylation



amines, amides, imines et acides carboxyliques avec pour ordre de réactivité : alcools > phénols > acides carboxyliques ~ amines > amides. Les aldéhydes et cétones existent en équilibre avec leur forme *énol* qui peut être dérivée par silylation (TMS). Cela conduit à des dérivés instables et il est préférable d'utiliser la méthoxylation avant l'ajout d'agent de silylation, de façon à convertir les énols en oxymes. E : configuration *entgegen*, opposée. Les groupes prioritaires sont du côté opposé l'un de l'autre par le plan formé par la double liaison. Z : configuration *zusammen*, ensemble. Les groupes prioritaires sont du même côté du plan formé par la double liaison.

Figure 94. Double dérivation des échantillons destinés au profilage métabolique en GCMS. On utilise le processus de silylation qui remplace un hydrogène acide en groupement TMS (-Si(CH₃)₃), rendant ainsi la molécule moins polaire et plus volatile. Les atomes d'hydrogène actifs sont présents dans de nombreux groupes fonctionnels : alcools, thiols,

b) Méthode GC-MS

Un appareil Agilent 6890 est utilisé pour le passage automatique des échantillons. L'injection est réalisée sur 1 μL à l'aide d'une seringue de 10 μL . La colonne chromatographique utilisée pour la méthode GC est de type RTX5 (longueur 40 m, diamètre 250 μm et épaisseur 0,25 μm). La température maximale utilisée est 360 °C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium, à un débit de 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La vitesse d'acquisition est de 20 Hz et la rampe de température se fait selon la méthode suivante : 2 min à 80 °C suivi d'une augmentation de 15 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à 330°C pendant 6 min. Le spectromètre de masse utilisé est un Pegasus® III (Leco®) qui permet un taux d'acquisition de 20 spectres par seconde. Les cartes de chaleur et analyses en composantes principales (PCA) sont réalisées avec le logiciel MeV, les tests statistiques avec le logiciel SigmaStats.

H- Dosage des pools d'acide salicylique libre par technique HPLC

1- Extraction

Ce protocole correspond à celui présent dans la publication de (Simon et al., 2010). Les échantillons de feuilles (entre 100 et 200 mg de matière fraîche) ont été congelés dans l'azote liquide et broyés à l'aide d'un broyeur à billes (1 min, 30 Hz). Une quantité connue d'acide salicylique marqué (SA*) au [^{14}C] (1 nCi, 54 mCi mmole^{-1} , NEN) a ensuite été ajoutée à chaque échantillon afin d'évaluer le rendement d'extraction. La quantité de SA* ajoutée est inférieure au seuil de détection du SA en HPLC. L'échantillon a alors été extrait avec une solution de méthanol 90 % V/V (500 μL pour 100 mg de matière fraîche) vortexé quelques secondes puis centrifugé 15 min à 10000 g. Les surnageants ont été récupérés et conservés à température ambiante. Les culots ont été à nouveau extraits avec la même quantité de méthanol 100 % pendant 15 min puis centrifugés 15 min à 10000 g. Les nouveaux surnageants ont été récupérés, additionnés aux premiers, séchés au speed-vacuum (environ 4 h) puis stockés dans un dessiccateur.

2- Dispositif expérimental

Le système HPLC (chromatographie liquide à haute performance; Waters®-Alliance®) comporte un injecteur automatique (W717; Waters®), un système de pompage (W1525; Waters®), un détecteur UV à barrette de diodes (PDA; Photo Diode Array; Waters® 2996) et un détecteur de fluorescence à longueurs d'ondes multiples (W2475, Waters®). Le PDA permet d'acquérir un spectre d'absorption de l'échantillon entre $\lambda = 200$ nm et $\lambda = 600$ nm, toutes les deux secondes (acquisition en 3D de l'absorption en fonction de la longueur d'onde et du temps). Le détecteur de fluorescence permet de faire varier la longueur d'onde d'excitation entre $\lambda = 200$ nm et $\lambda = 890$ nm ou d'émission entre $\lambda = 210$ nm et $\lambda = 900$ nm.

3- Quantification des pools libres

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

4- Calcul du rendement de l'extraction par comptage radioactif

Une aliquote des échantillons repris dans le tampon de charge est utilisé pour le comptage du SA marqué au [14 C] (SA*). Pour 3000 cpm maximums attendus, 1,4 mL de liquide scintillant sont ajoutés aux aliquotes précédentes. Le comptage radioactif est effectué dans un compteur à scintillation (type LS 6000IC, Beckman®). Chaque échantillon est analysé trois fois dix minutes, puis le rendement est obtenu par calcul de la moyenne des trois comptages.

5- Traitement et comparaison des données

L'intégration des aires des pics des chromatogrammes obtenus, réalisée avec le logiciel Empower™ software system (Waters®), a été effectuée manuellement. Les aires des pics ont ensuite été corrigées par rapport au rendement d'extraction et rapportées à la masse de matière fraîche. La quantification absolue du SA a été réalisée à partir d'une gamme étalon obtenue avec un standard de SA.

I- Dosage des glucosinolates par HPLC

1- Méthode d'extraction

Cent mg de feuilles ont été prélevés et directement congelés dans l'azote liquide. Après lyophilisation pendant 2 jours, les extraits sont broyés pendant 2 min. Un mL de méthanol 80% est ajouté dans chaque échantillon et broyé pendant 2 min à 30 Hz. Après 15 min d'incubation, les extraits sont centrifugés 10 min à 3500 rpm. Quatre fois 200µL de surnageant sont chargés sur colonne DEAE Séphadex préalablement reconstituée avec 1 mL d'eau pendant 3 h puis séchés sous vide et ajout de 0,5 mL de méthanol 80%. Les échantillons sont ensuite lavés avec 0,5 mL de méthanol 80% puis 2 x 1 mL d'eau et pour finir 0,5mL de tampon MES (0,02 M, pH 5,2). Puis 25 µL de sulfatase (Sigma-Aldrich®) sont ajoutés et laissés incubés durant la nuit. La sulfatase est préparée de façon suivante : 700 mg de sulfatase from *Helix pomatia* Type H-1 (10 000 U.g⁻¹) sont mélangés avec 30 mL d'eau et 30 mL d'éthanol absolu. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 20 min, le surnageant est transféré dans une nouvelle bouteille, 90 mL d'éthanol absolu sont ajoutés puis une nouvelle centrifugation est appliquée. Le surnageant est alors écarté et le culot dissout dans 25 mL d'eau.

2- Analyse

Les glucosinolates désulfatés ont été analysés par HPLC d'après le protocole décrit par (Pfalz et al., 2007). Chaque échantillon a été injecté (25 µL) dans un système HPLC Dionex UltiMate™ 3000 Rapid Separation, équipé d'une colonne Hewlett Packard HP LiChroCART® 250-4 100 RP-18 encapped (support de gel de silice en phase inversée C-18, taille de particules de 5 µm et colonne de 250 mm). L'élution a été réalisée suivant un gradient de solvant eau (solvant A) – acetonitrile (solvant B) programmé : 1,5 – 5% (v/v) B (6 min), 5 – 7% B (2 min), 7 – 21% B (10 min), 21 –

29% B (5 min), 29 – 43% B (7 min), 43 – 92% B (0,5 min), 92% B (2,5 min), 92 – 1,5% B (0.5 min), 1,5% B (4,5 min). Les glucosinolates ont été identifiés grâce à leur temps de rétention et à leur spectre UV. Ils ont été quantifiés à partir des aires des pics des chromatogrammes obtenus à 229 nm, après application d'un facteur de correction comme décrit par Brown et al., (2003).

J- Dosage des hormones par LC-MS

1- Extraction des échantillons

250 mg de matière fraîche de feuilles sont broyées dans un mortier avec de l'azote liquide. Après évaporation de l'azote, 1 mL de méthanol/H₂O (80/20) sont ajoutés et le broyage est poursuivi. Dans un tube de 2 mL, le broyat est transvasé et les échantillons centrifugés pendant 15 min à 14000 rpm à 4°C. Les surnageants sont récupérés dans un nouveau tube et le culot est redissout dans 1 mL de méthanol/H₂O (80/20) à l'aide d'un thermomixeur à 10°C, à 2 000 rpm pendant 10 min. Puis, les échantillons sont centrifugés 15 min, à 14 000 rpm et à 4°C. Les deux surnageants sont alors rassemblés et 2 aliquotes de 1 mL sont constituées. Les échantillons sont filtrés sur des filtres seringues (0,20 µm, PTFE millipore) puis séchés au speed-vacuum.

2- Purification des échantillons par SPE (« sample preparation »)

Les cartouches SPE (Strata™ X-C de chez Phenomenex®) sont conditionnées avec 1 mL de méthanol puis équilibrées avec 1 mL d'H₂O acidifié à 0,1% d'acide formique. Les échantillons sont dissouts avec 1 mL de tampon phosphate à 10 mmol.L⁻¹ acidifié avec 0,1% d'acide formique. Les échantillons sont ensuite chargés sur les cartouches et les cartouches lavées avec 1 mL d'H₂O acidifié à 2% d'acide formique. Ces fractions sont récupérées dans des tubes de 2 mL. Après 4 éluions avec 0,5 mL d'une solution à 5% de NH₄OH dans du méthanol, les différentes fractions sont récupérées dans un tube de 15 mL. Puis, ces fractions sont séchées au speed-vacuum.

3- Préparation des échantillons pour le couplage LC-MS

Les fractions brutes et les SPE sont dissoutes avec 100 μL d' H_2O , et transférées dans les vials. Les paramètres de la LC-MS (UPLC Acquity, Waters®) sont les suivants. La colonne utilisée est Kinetex® 1,7 μm XB-C18 100 Å 100 x 2,1 mm. Les tampons utilisés sont tampon A H_2O 0,1 % acide formique, tampon B acétonitrile 0,1 % acide formique. Une boucle de 5 μL , avec un débit de 0,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ est utilisée. Le gradient utilisé est le suivant à $t = 0$ min 1% de tampon B, à $t = 2$ min 45% de B, de $t = 2$ min à $t = 3$ min un palier avec 45% de B, à $t = 4$ min 100% de B, un second palier jusqu'à $t = 5$ min (rinçage de la colonne), à $t = 7$ min 1% de B (préparation de la colonne pour l'injection suivante) et enfin un dernier palier jusqu'à $t = 9$ min (rééquilibrage de la colonne). Les paramètres du spectromètre de masse (MicrOTOF II, Bruker) sont les suivants. Les paramètres de la source sont les suivants : utilisation d'azote gazeux à une pression de 4 bars au niveau du nébuliseur (nebulizer) et d'un débit de 8,5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ au niveau du gaz de séchage (dry gas). La température de séchage est réglée à 195°C. Le paramètre « End plate offset » est de -500 V. Le paramètre « Capillary » est -4 500 V en mode positif et +3 700 V en mode négatif. Les paramètres de la ligne de transfert des ions ont été optimisés pour la gamme de masse 50-800 m/z , que ce soit pour le mode positif ou négatif.

K- Analyses par couplage EA-IRMS

L'EA-IRMS se compose d'un analyseur élémentaire (EA) couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS) (type NA1500, Carlo Erba, GV Instruments, UK). L'analyseur élémentaire (EA) permet de séparer l'azote et le CO_2 gazeux issus des échantillons après combustion, réduction puis passage dans une colonne de chromatographie gazeuse. Le spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS) est un instrument destiné à séparer les ions et les molécules chargés d'un échantillon suivant leur masse. Les gaz séparés sortent de l'EA, entrent dans l'IRMS où les isotopes sont ionisés puis séparés dans un champ magnétique. Les isotopes sont détectés séparément et le niveau de ^{15}N est déterminé suivant leur ratio. La calibration du système se fait en utilisant des standards dont on connaît à la fois la quantité d'azote total (pourcentage d'azote, noté % N) et la quantité de ^{15}N , ici l'atropine (Sigma-Aldrich®). Le spectromètre de masse permet une mesure relative

de l'abondance isotopique de l'échantillon étudié par rapport à un échantillon étalon. On utilise alors une unité relative d'expression de la composition isotopique, notée $\delta^{15}\text{N}$ (‰) et correspondant à la variation $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$. La précision de la mesure est de $\pm 0,1$ ‰. L'appareillage se constitue d'un spectromètre de masse Optima (Micromass) couplé à un analyseur élémentaire Flash-EA (Thermo Fisher Scientific). Ces analyses ont été réalisées par Marlène Lamothe de la Plateforme Métabolisme Métabolome (PMM). Les échantillons solides de feuilles ou racines sont pesés de manière à obtenir suffisamment de matière détectable par l'IRMS, c'est-à-dire environ 2 mg. Ces valeurs à peser sont déterminées suivant le % N dans l'échantillon par référence à un standard utilisé pour calibrer l'appareil, ici l'atropine. Cette dernière est calibrée par rapport à l'acide glutamique certifié IAEA (International Atomic Energy Agency). Les échantillons sont disposés individuellement dans des nacelles en étain souples qui sont ensuite délicatement pliées et introduites dans le passeur automatique de l'EA. Chaque échantillon passe individuellement à travers le tube de combustion de l'analyseur et les gouttes d'étain restent emprisonnées dans une allonge située à l'extrémité supérieure du tube. Tous les trois échantillons, un passage de standards est couplé afin de corriger d'éventuelles dérives du signal isotopique au cours de l'analyse. Les paramètres de la source sont fixés avec une intensité d'ionisation de 600 μA et une pression interne de 4,5 à 10,6 mbars dans la chambre d'ionisation.

VII. Approches physiologiques

A- Stress biotiques

1- Bactérie

a) Cultures des bactéries *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst)

La culture des bactéries est réalisée en conditions stériles par étalement d'un peu de stock glycérolé sur milieu solide LB agar sélectif contenant 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicine et 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de kanamycine. Cette culture est réalisée deux jours dans une étuve à 30°C. Une colonie isolée est ensuite repiquée dans un erlenmeyer contenant 50 mL de milieu LB liquide supplémenté à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicine et 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de kanamycine et incubée pendant une nuit à 30°C sous agitation (150 rotations par minute [rpm]). Le jour de l'inoculation, les bactéries sont sédimentées

une première fois par centrifugation (10 min à 3000g) dans un tube stérile de 50 mL. Le culot bactérien obtenu est lavé dans environ 50 mL de MgCl₂ 10 mM. Les bactéries sont sédimentées une deuxième fois par centrifugation. Le deuxième culot est alors resuspendu dans un faible volume de MgCl₂. La concentration en bactéries dans la suspension est évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm, puis ajustée par ajout de MgCl₂ 10 mM, sachant que 1 unité DO à 600 nm correspond à 0,0001 unités formant des colonies (cfu) par mL de suspension.

b) Inoculations de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Les plantes ont été inoculées par infiltration de suspensions de *Pst* ou *Pst-AvrRpm1* à 10⁷ cfu.mL⁻¹ pour toutes les analyses métaboliques, cytologiques et de suivi de la transcription de gènes. Pour les tests de résistance, l'infiltration des plantes a été effectuée avec des suspensions de *Pst* et de *Pst-AvrRpm1* diluées à 10⁵ cfu.mL⁻¹. D'autres tests de résistance ont été réalisés par pulvérisation des feuilles avec une suspension de *Pst* préparée à 10⁸ cfu/mL⁻¹. Dans tous les cas, le traitement témoin correspond à un traitement avec une solution stérile de MgCl₂ à 10 mM (solvant de dilution des bactéries).

c) Tests de résistances des plantes vis-à-vis de *Pst* et *Pst-AvrRpm1*

1) Test de résistance par infiltration des souches bactériennes

Les inoculations de *Pst* et *Pst*□*AvrRpm1* ont été réalisées sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 6 semaines (stade rosette) cultivées en chambre de culture jours courts (photopériode de 8 h de lumière, sous intensité lumineuse de 200 μmoles de photons.m⁻².s⁻¹). Un jour avant l'inoculation, les plantes sont placées sous humidité saturante à l'aide d'une mini serre de sorte que les stomates soient bien ouverts le jour des inoculations. L'inoculation est réalisée en milieu de matinée, à l'aide d'une seringue de 1 mL sans aiguille en infiltrant la face abaxiale avec une suspension bactérienne à 10⁵ cfu.mL⁻¹. Les feuilles inoculées sont repérées avec un trait fin de feutre sur leur pétiole. Cinq plantes par génotype sont inoculées sur 3 à 5 feuilles. Les plantes sont ensuite replacées sous humidité saturante dans des mini serres en chambre de culture jours courts pour 24 h puis la mini serre est retirée.

Les plantes ont été prélevées à différents temps (heures) après inoculation. . Pour chaque temps, cinq échantillons ont été générés. Pour chaque échantillon, 6 disques foliaires de 0,5 cm de diamètre chacun par plante ont été prélevés sur 3

plantes (2 disques par plante). Les disques ont été placés dans des tubes contenant une bille en métal (de 0,5 cm de diamètre) et 400 μL d'eau stérile, puis broyés à l'aide d'un broyeur à billes (1 min à 20 Hz). Des dilutions sériées du broyat ont été réalisées de dix en dix puis, six fois 10 μL de chaque dilution ont été étalés indépendamment sur du milieu LB agar, additionné de rifampicine et de kanamycine (à 50 et 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement). Après incubation 48 h à 30°C, les colonies ont été dénombrées à la dilution appropriée (Katagiri et al., 2002).

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

2) Test de résistance par pulvérisation des bactéries *Pst*

Similairement à la préparation des bactéries infiltrées, les bactéries pulvérisées sont préparées dans du MgCl_2 10 mM stérile mais sont pulvérisées à l'aide d'un pulvérisateur à une concentration bactérienne correspondant 10^8 cfu/mL en présence d'un surfactant, le Silwett-L77 à 0,02%. Les plantes sont pulvérisées par lot, avec une plante de chaque génotype par lot. Un volume adéquat (environ 6 mL pour 4 à 5 plantes) de suspension bactérienne est réparti par pulvérisation de gouttelettes fines à la face supérieure des feuilles de l'ensemble des rosettes du lot de plantes. Les plantes sont ensuite replacées dans les mêmes conditions de culture mais ne sont pas recouvertes de la mini serre. Pour l'observation des stomates et la quantification de leur degré d'ouverture, les plantes ont été pulvérisées de la même façon, en début de photopériode, et les stomates présents au niveau de la face supérieure de l'épiderme observés en microscopie optique 2 h après inoculation. Les plantes témoins correspondent à des plantes pulvérisées avec du MgCl_2 10 mM additionné de Silwett-L77 à 0,02%.

d) Inoculation et échantillonnage pour les analyses métabolomiques et transcriptomiques

Pour les analyses métabolomiques et transcriptomiques, les bactéries sont infiltrées à une concentration de 10^7 cfu.mL⁻¹ suivant le protocole décrit précédemment. En parallèle, des plantes témoins sont infiltrées de la même façon, avec une solution de MgCl₂ à 10 mM stérile. Pour les analyses transcriptomiques, une feuille est prélevée par génotype par temps et par condition directement congelée dans l'azote liquide puis conservée à -80°C. L'expérience est réalisée sur au minimum trois réplicats biologiques. En ce qui concerne les analyses des anti-oxydants et les dosages d'acide salicylique, environ 100 à 150 mg de feuilles sont prélevés par temps et par condition puis également immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

2- *Champignon*

Les spores de *Botrytis cinerea* sont récoltées par ratissage de la culture fongique dans du milieu PDB dilué au 1/2 (*Potato Dextrose Broth*) puis filtration de cette solution. Après comptage à l'aide d'une cellule de Thoma la concentration de la suspension est ajustée à 5.10^4 spores.mL⁻¹. Les inoculations sont réalisées par le dépôt de 2 gouttes de 5 µL de spores de part et d'autre de la nervure centrale de feuilles bien développées. Trois à 4 feuilles de chaque plante sont inoculées ainsi. Les plantes sont placées en conditions de jours courts, sous humidité saturante. L'évolution des nécroses est analysée par mesure du diamètre moyen de chaque lésion (moyenne sur la mesure de 2 diamètres perpendiculaires).

3- *Pucerons*

a) *Myzus persicae*

Myzus persicae (Sulzer) ou puceron vert du pêcher appartient à l'ordre des hémiptères et la famille des aphides. Aphide généraliste, autrement dit, polyphage sur de nombreuses espèces végétales. Il pénètre entre les cellules végétales grâce à son mince stylet jusqu'au phloème où il puise des nutriments sans provoquer de dégâts majeurs à la plante (Louis et al., 2012). Cet insecte a été manipulé au laboratoire d'Ecologie systématique et évolution (ESE, Université Paris Sud, Orsay), dans le cadre d'une collaboration avec Dr. Marina Pfalz et Dr. Jüergen Kroymann.

b) Tests pucerons

Une culture de pucerons appelée « origine » a été réalisée environ 7 jours avant le début de la manipulation, le but étant de pouvoir inoculer les plantes avec des pucerons du même âge. Vingt plantes par génotype testé, âgées de 4 semaines, ont été inoculées. Chaque plante a reçu six pucerons « origine ». Les pucerons « origine » ont été prélevés sur leur plante de culture, délicatement à l'aide d'un pinceau et déplacés sur les feuilles de chaque plante testée. La plante ainsi inoculée a été ensachée individuellement afin que les pucerons restent en place. Neuf jours après inoculation, les pucerons étant capables de se reproduire de façon asexuée, le nombre de nouveaux pucerons a été dénombré. Pour cela, les rosettes de chaque plante ont été sectionnées au ras de la terre, puis chaque feuille a été prélevée à l'aide d'un scalpel et d'une pince pour simplifier le comptage des pucerons à la loupe. Le nombre moyen de pucerons par plante a ensuite été calculé. Le comptage a été réalisé sur trois séries de plantes indépendantes contenant chacune 15 plantes par génotype.

c) Echantillonnage

Pour les analyses transcriptomiques, une feuille est prélevée par génotype par temps et par condition directement congelée dans l'azote liquide puis conservée à -80°C. L'expérience est réalisée sur au minimum trois réplicats biologiques. En ce qui concerne les analyses des antioxydants et les dosages de glucosinolates, environ 100 mg de feuilles sont prélevés par temps et par condition puis également immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

B- Stress abiotiques

1- Stress nitrates : Tests de germination *in vitro*

Les tests de germination sont réalisés soit sur un milieu quart-Hoagland's (5 mM d'azote) soit sur un milieu quart-Hoagland appauvri en nitrates (0.2 mM d'azote) (Hoagland, 1920). La composition du milieu Quart Hoagland est donnée par le tableau suivant ci-après.

Cinquante graines par génotype ont été semées sur chacun des milieux. Le suivi de la germination est réalisé sous loupe binoculaire. La germination est considérée comme réalisée, lorsqu'il y a eu protrusion radiculaire.

Tableau 2. Composition du milieu quart-Hoagland

Macronutrients								
S.No		MW	200 X Stock (g/L)	Nutrient	Stock Conc. (mM)	1 X conc/L (mM)	Final 0.25 X (mM)	Vol to take 1 lit (ml)
1	KH ₂ PO ₄	136,09	27,2	P	200	1	0,25	1,25 ml
2	KNO ₃	101,11	101,11	N/K	1000	5	1,25	
3	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,15	189	N	800	4	1	
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	98,6	S, Mg	400	2	0,5	
Macronutrients are prepared separately in 200 ml volume each								
5	FeDTA	367,1	9,2 (100X)	Fe	25	0.25	0,06	2,4 ml
FeDTA is prepared in amber colour bottle								

Micronutrients							
S.No		MW	200 X Stock (g/L)	Nutrient	Stock Conc. (mM)	1 X final (mM)	
6	CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68	0,375	Cu	1,5	1,5 µmol	1 ml
7	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,54	0,575	Zn	2	2,0 µmol	
8	MnSO ₄ .H ₂ O	169,01	1,69	Mn	10	10 µmol	
9	H ₃ BO ₃	61,83	3,092	B	50	50 µmol	
10	MoO ₃	143,94	0,144	Mo	0,1	0,1 µmol	
11	KCl	74,55	3,728	Cl	50	50 µmol	
Micronutrients Stock is prepared in 200 ml (all the nutrients are in the same stock, amber colour bottle)							

2- Forte lumière, forte température

Les plantes de 7 semaines ont été laissées 1 semaine à 37°C, sous intensité lumineuse 350 µmol.m².s⁻¹ sous photopériode 8h de lumière 16 h d'obscurité. L'irrigation constante a été maintenue durant cette semaine.

3- Stress hydrique

a) Mise en place du stress hydrique

Un stress hydrique a été appliqué sur l'ensemble des génotypes six ou sept semaines après semis. La cinétique se compose de 4 points. J-0 début du stress hydrique, J+6, J+9 et J+12. Des plantes témoins de chacun des génotypes, hydratées ont également été utilisés lors de cette cinétique

b) Mesure de la teneur en eau des plantes

Les biomasses fraîches et sèches ainsi que la teneur en eau (exprimée par rapport à la masse de matière fraîche des rosettes) ont été déterminées sur des plantes n'ayant servi à aucune autre mesure. La teneur en eau des rosettes de 6

plantes témoins et de 6 plantes stressées a été déterminée depuis la sixième semaine (t=0) pendant les 12 jours de contrainte hydrique (4 points de mesure au total : t=0, J+6, J+ 9, J+12). Pour chaque expérience, 12 rosettes par génotype ont été sacrifiées. Les plantes ont toutes été sacrifiées en milieu de photopériode.

c) **Mesure du contenu relatif en eau des plantes**

Les biomasses fraîches et sèches ainsi que le contenu relatif en eau (Relative Water Content = RWC) des rosettes de 6 plantes témoins et de 6 plantes stressées ont été déterminées depuis la sixième semaine (t=0) pendant les 12 jours de contrainte hydrique (4 points de mesure au total : t=0, J+6, J+ 9, J+12). Douze plantes ont par génotype donc été sacrifiées le matin, toujours à la même heure, à chaque date de mesure. Le poids frais a été mesuré directement après prélèvement. Le poids sec a été mesuré 3 jours après passage de la rosette à 50°C. Le poids hydraté a été mesuré 1 jour après hydratation.

d) **Mesure du potentiel hydrique**

Quatre feuilles par plante environ sont prélevées, piquées à l'aide d'une épingle d'entomologiste (environ 140 trous par feuille) et déposées dans le récipient du WP4. Les mesures sont réalisées à 25°C à l'aide d'un WP4-T Dewpoint Potentiometer (Decagon devices, USA) jusqu'à stabilisation. Les micro-piqûres permettent une stabilisation plus rapide des mesures. L'acquisition des mesures se fait pendant 45 min et la valeur de stabilisation correspond à la mesure du potentiel hydrique foliaire de l'échantillon. Les valeurs données par le Dewpoint hygrometer sont très proches de celles obtenues sur feuilles entières en utilisant HPFM (high pressure flow meter) chez le tabac (Nardini et al., 2008). Ceci suggère que cette technique offre des valeurs fiables de potentiel hydrique foliaire même si elle est appliquée sur des feuilles indépendantes isolées.

e) **Contenu relatif en eau des pots**

L'humidité relative du substrat et la masse de 5 pots témoins et de 5 pots stressés ont été déterminées tout au long du stress]. Lors de la cinétique de déshydratation, les mesures ont été effectuées le matin, à la même heure, sur les mêmes pots. Les pots identifiés pour ces mesures n'ont servi à aucune autre mesure.

C- Analyses des échanges gazeux

L'analyse des échanges gazeux donne accès à certaines mesures physiologiques comme les paramètres photosynthétiques et respiratoires. Nous avons utilisé un système dit ouvert, adapté à la taille des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Il permet le renouvellement perpétuel de l'air disponible au niveau de la feuille. L'appareillage est constitué d'un appareil LI-6400 XT (LI-COR®, Lincoln, USA) possédant deux analyseurs IRGA (Infra Red Gaz Analyser) qui mesurent en permanence la fraction molaire en CO₂ dans le canal de référence (air entrant) et le canal de mesure (air sortant) de la chambre de mesure. Celle-ci est composée d'une pince hermétique clipable. Cet appareillage est complété par un système de décarboxylation de l'air à l'aide de chaux sodée présent sur le LI-COR et d'un régulateur d'humidité *dew point generator* LI-610 (LI-COR®, Lincoln, USA). La procédure expérimentale consiste à piéger à l'obscurité une feuille intacte dans la chambre refermée hermétiquement à l'aide de térostat (Teroson, Suresnes, France). L'air est tout d'abord entièrement décarboxylé par de la chaux sodée, jusqu'à stabilisation du signal enregistré par l'analyseur IRGA (environ 30 min). La chaux sodée est ensuite court-circuitée et un gaz de concentration en CO₂ connue est appliqué à la feuille (fraction molaire en CO₂ de 400 μmol.mol⁻¹ (ppm) et 21 % d'O₂). La source lumineuse (LED bleues et rouges) est ensuite allumée (300 μmoles de photons.m⁻².s⁻¹) puis après 15 min de stabilisation, les mesures de photosynthèse sont effectuées sous une température foliaire de 25°C et une humidité de 60%. L'entrée de vapeur d'eau est monitorée par le *dew point generator* Li-610. Après deux heures d'éclairement, la source lumineuse est éteinte et les mesures de respiration à l'obscurité sont effectuées. La mesure des échanges gazeux peut être effectuée en faisant varier différents paramètres expérimentaux (fraction molaire en CO₂, intensité lumineuse, température foliaire, etc.). Deux courbes de mesures ont été établies : la courbe A(PAR), c'est-à-dire la photosynthèse nette (A) en fonction de l'intensité lumineuse (*Photosynthetic Active Radiation*, PAR) et la courbe A(Ci), qui représente A en fonction de la fraction molaire en CO₂ (Ci). La quantité de gaz échangée entre la feuille et l'air est mesurée en comparant la concentration en CO₂ pré- et post-opératoire. L'assimilation photosynthétique nette (A) est calculée selon le bilan de masse suivant : $A = [(CO_2R - CO_2S)/V.S].D$ où CO₂R est la fraction molaire en CO₂ dans le canal de référence entrant (c'est à dire l'air entrant), CO₂S la fraction

molaire en CO₂ du canal de référence sortant (air sortant), V le volume molaire (L.mol⁻¹) de l'air à température et pression considérées, S (m²) la surface de la feuille et D (L.s⁻¹) le débit de l'air entrant dans la chambre.

VIII. Mesure d'influx : marquage au ¹⁵N

Après 28 jours de croissance en milieu hydroponique, des mesures d'influx ont été réalisées sur l'ensemble des lignées afin de déterminer la vitesse d'absorption du nitrate par les racines. Chaque partie racinaire des plantes est rincée dans une solution de CaSO₄ à 0.1mM pendant 1 minute puis trempée dans une solution marquée à 98% de ¹⁵NO₃⁻ (K¹⁵NO₃ + Ca(¹⁵NO₃)₂ en proportion 4/5-1/5) d'une concentration de 0,2 mM ou de 5 mM pendant 5 min. Ces deux types de concentration de ¹⁵NO₃⁻ sont utilisés au laboratoire pour étudier respectivement la vitesse d'absorption du nitrate par les transporteurs à forte et à faible affinité (respectivement HATs pour « high affinity transporters » et LATs pour « low affinity transporters »). Puis les racines sont rincées de nouveau dans une solution de CaSO₄ à 0,1 mM pendant 1 min. Les parties aériennes et racinaires sont séparées avant d'être séchées et pesées et congelées dans de l'azote liquide. Les échantillons racinaires sont ensuite broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et pilon. La poudre obtenue est placée dans une étuve à 60°C pendant trois jours afin d'obtenir la matière sèche. Deux ng de matière sèche de racines sont pesés dans une nacelle en étain et analysés en EA-IRMS à l'INRA de Versailles afin de déterminer la teneur en azote total des échantillons ainsi que leur abondance isotopique. La vitesse d'absorption du nitrate est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Uptake } (\mu\text{mol N/h/gMS}) = ((\% \text{ N} \times 10^6) / (100 \times 14)) \times (\text{E}\% \text{ échantillon racinaire} / \text{E}\% \text{ source}) \times 12$$

%N en g N pour 100 g MS

E% échantillon : excès isotopique de l'échantillon = Abondance isotopique – abondance naturelle (déterminée sur 6 échantillons non marqués, elle vaut, 0,3715%)

E% source : enrichissement de la source (solution de marquage) = 98% ¹⁵N dans la solution (l'abondance naturelle est négligée).

IX. Techniques d'Imagerie

A- Observations en fond clair ou contraste interférentiel

A l'aide d'un microscope photonique droit (Axioskop ZEISS) associé à une caméra numérique refroidie (SPOT RT Slider, Diagnostic Instrument) et son logiciel de pilotage et acquisition (SPOT du même constructeur), des images des stomates sur les différentes lignées (*Ctrl*, *mAO1* et *35S ::AO1*) ont été réalisées. Trente images de différentes zones de feuilles de cinq plantes par lignée ont été réalisées. L'aire des ostioles a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (National Health Care, USA).

B- Microscopie confocale à balayage laser

Afin d'étudier la densité stomatique et l'ouverture des stomates, des acquisitions ont été réalisées avec un microscope confocal inversé équipé d'un laser à lumière blanche pulsée (TCS SP8, Leica) sur la plateforme IMAGIF (CNRS, Gif sur Yvette, France). Une surface de 0,5cm² de feuilles a été découpée et placée entre lame et lamelle (face inférieure contre la lamelle). Les acquisitions ont été réalisées avec les paramètres suivants : objectif 40X (ou dit x40), une résolution (X ;Y) 512*512 et 200Hz, photomultiplicateurs activés pour une fenêtre de récupération 480nm- 600nm pour le canal vert et pour le canal rouge une fenêtre de récupération de 690nm- 770nm. Afin d'observer les cellules épidermiques, dans le but de calculer l'index stomatique, d'autres acquisitions ont été réalisées en activant/utilisant le photomultiplicateur de lumière transmise avec un gain de 400. L'index stomatique se calcule selon la formule suivante : $100 \times \text{nombre de stomates} / (\text{nombre de stomates} + \text{nombre de cellules épidermiques})$.

X. Analyse du niveau de ploïdie par cytométrie en flux

Afin de vérifier la ploïdie des différentes lignées, une analyse en cytométrie de flux (analyseur de ploïdie) a été réalisée en collaboration avec la plateforme IMAGIF, CNRS, Gif sur Yvette. Ces analyses ont été réalisées avec l'aide de Mick Bourge et avec l'appareillage PARTEC CyFlow SL 532 nm. Ce CyFlow SL3 (Partec) est équipé d'un laser diode 532 nm 100 mW Forward- et Side-scatter, deux canaux de fluorescence et permet une mesure absolue de volume. Les analyses ont été réalisées sur 5 plantes de chacune des lignées (1 lignée sauvage et 2 lignées mutantes).

XI. Paramètres de croissance

A- Cinétique de développement

Une cinétique de développement des plantes a été réalisée. Pour cela, une fois par semaine les plantes de chacune des lignées ont été mesurées, pesées et photographiées. Un échantillonnage a également été réalisé durant cette cinétique afin de mesurer les niveaux des pools de NAD.

B- Détermination du ratio partie aérienne / partie racinaire

Grâce aux plantes cultivées en hydroponie, le ratio partie aérienne (mg) / partie racinaire (mg) a pu être déterminé. Pour cela, les parties racinaires ont été séparées des parties aériennes sur 10 plantes âgées de 6 semaines par génotype.

C- Détermination MF/MS

Le ratio masse fraîche (mg) / masse sèche (mg) a été réalisé en prélevant la totalité de la plante. Chaque plante a directement été pesée puis mise à l'étuve à 60°C durant 3 jours et repesée à nouveau afin d'obtenir la matière sèche (mg). Ce ratio a également été mesuré pour 30 plantes de 6 semaines par génotype. Cette expérience a également été réalisée sur des disques foliaires prélevés à l'aide d'un emporte-pièce (diamètre 0,8 cm) sur des plantes âgées de 6 semaines, ceci afin de déterminer le ratio masse fraîche / masse sèche surfacique.

D- Quantification du nombre de siliques

Après 60 jours de culture en conditions jours longs (photopériode 16 h de lumière / 8 h d'obscurité), le nombre de siliques a été quantifié sur l'ensemble des lignées sur 100 plantes par génotype.

E- Remplissage des siliques

Les siliques commençant à jaunir sont prélevées et conservées dans du fixateur acide acétique / éthanol 100% (3 :1, v/v). Les siliques sont ensuite décolorées à l'éthanol 70% pendant 2 h, puis immerger à l'obscurité dans une solution de 50 mL préalablement préparée contenant 8 g de chloral hydrate 1 mL

d'eau et 2 mL de glycérol 50%. Dix siliques par plante sur trois plantes de chaque génotype ont été observées à la loupe (loupe binoculaire SVII ZEISS).

F- Quantification du rendement en graines

Afin de déterminer le rendement en graines des différentes lignées. Trois fois 500 graines de chaque lignée ont été pesées afin de déterminer le poids des graines. L'ensemble des graines a été récolté et pesé. Connaissant le poids de 500 graines pour chacun des génotypes, le rendement en graines a été déterminé. La quantification du nombre de graines par plante a été réalisée sur 60 plantes par génotype.

XII. Analyses *in silico*

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

A- Les sites de bases de données génomiques et protéomiques

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

Stock Center (NASC, <http://arabidopsis.thaliana.info/>) et du *Arabidopsis Biological Resource Center* aux Etats-Unis (ABRC, <http://abrc.osu.edu/>).

B- Genevestigator

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

C- MeV

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

D- Brenda

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

E- Image J

Le logiciel ImageJ a été utilisé pour analyser les clichés réalisés avec le microscope et le microscope confocal en utilisant le plugin Loci permettant d'obtenir les stomates en trois dimensions (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

**Références
bibliographiques**

Bibliographie

- Acheson SA, Kirkman HN, Wolfenden R** (1988) Equilibrium of 5,6-hydration of NADH and mechanism of ATP-dependent dehydration. *Biochemistry* **27**: 7371–5
- Adams-Phillips L, Briggs AG, Bent AF** (2010) Disruption of poly(ADP-ribosylation) mechanisms alters responses of Arabidopsis to biotic stress. *Plant Physiol* **152**: 267–80
- Adams-Phillips L, Wan J, Tan X, Dunning FM, Meyers BC, Michelmore RW, Bent AF** (2008) Discovery of ADP-ribosylation and other plant defense pathway elements through expression profiling of four different Arabidopsis-Pseudomonas R-avr interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 646–57
- Agrimi G, Russo A, Pierri CL, Palmieri F** (2012) The peroxisomal NAD⁺ carrier of Arabidopsis thaliana transports coenzyme A and its derivatives. *J Bioenerg Biomembr* **44**: 333–40
- Ahlfors R, Lång S, Overmyer K, Jaspers P, Brosché M, Tauriainen A, Kollist H, Tuominen H, Belles-Boix E, Piippo M, et al.** (2004) Arabidopsis RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *Plant Cell* **16**: 1925–37
- Aleo MF, Giudici ML, Sestini S, Danesi P, Pompucci G, Preti A** (2001) Metabolic fate of extracellular NAD in human skin fibroblasts. *J Cell Biochem* **80**: 360–6
- Alkan N, Davydov O, Sagi M, Fluhr R, Prusky D** (2009) Ammonium secretion by Colletotrichum coccodes activates host NADPH oxidase activity enhancing host cell death and fungal virulence in tomato fruits. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 1484–91
- Allan E, Trewavas A** (1985) Quantitative changes in calmodulin and NAD kinase during early cell development in the root apex of Pisum sativum L. *Planta* **165**: 493–501
- Allen DK, Libourel IGL, Shachar-Hill Y** (2009) Metabolic flux analysis in plants: coping with complexity. *Plant Cell Environ* **32**: 1241–57
- Allen E, Moing A, Ebbels TM, Maucourt M, Tomos AD, Rolin D, Hooks MA** (2010) Correlation Network Analysis reveals a sequential reorganization of metabolic and transcriptional states during germination and gene-metabolite relationships in developing seedlings of Arabidopsis. *BMC Syst Biol* **4**: 62
- Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI** (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**: 1053–7

- Allen GJ, Muir SR, Sanders D** (1995) Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**: 735–7
- Alonso AP, Goffman FD, Ohlrogge JB, Shachar-Hill Y** (2007) Carbon conversion efficiency and central metabolic fluxes in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos. *Plant J* **52**: 296–308
- Adams-Phillips L, Wan J, Tan X, Dunning FM, Meyers BC, Michelmore RW, Bent AF** (2008) Discovery of ADP-ribosylation and other plant defense pathway elements through expression profiling of four different *Arabidopsis*-*Pseudomonas* R-avr interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 646–57
- Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI** (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**: 1053–7
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, et al.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–7
- Amor Y, Babiychuk E, Inzé D, Levine A** (1998) The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the oxidative stress responses in plants. *FEBS Lett* **440**: 1–7
- Andrabi SA, Kim NS, Yu S-W, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, et al.** (2006) Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18308–13
- Andrabi SA, Umanah GKE, Chang C, Stevens DA, Karuppagounder SS, Gagné J-P, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM** (2014) Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 10209–10214
- Aniszewski T** (2007) Alkaloids - Secrets of life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Elsevier 85–86
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373–99
- Arditti J, Tarr JB** (1979) Niacin biosynthesis in plants. *Am J Bot* **66**: 1105–1113
- 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**: 601–39
- Asai S, Mase K, Yoshioka H** (2010) Role of nitric oxide and reactive oxygen [corrected] species in disease resistance to necrotrophic pathogens. *Plant Signal Behav* **5**: 872–4

- Asai S, Ohta K, Yoshioka H** (2008) MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **20**: 1390–406
- Ashihara H, Deng W-W** (2012) Pyridine metabolism in tea plants: salvage, conjugate formation and catabolism. *J Plant Res* **125**: 781–91
- Ashihara H, Stasolla C, Yin Y, Loukanina N, Thorpe T A.** (2005) De novo and salvage biosynthetic pathways of pyridine nucleotides and nicotinic acid conjugates in cultured plant cells. *Plant Sci* **169**: 107–114
- Ashihara H, Yin Y, Deng W-W, Watanabe S** (2010) Pyridine salvage and nicotinic acid conjugate synthesis in leaves of mangrove species. *Phytochemistry* **71**: 47–53
- Ashihara H, Yin Y, Katahira R, Watanabe S, Mimura T, Sasamoto H** (2012) Comparison of the formation of nicotinic acid conjugates in leaves of different plant species. *Plant Physiol Biochem* **60**: 190–5
- Ashihara H, Yin Y, Watanabe S** (2011) Nicotinamide metabolism in ferns: formation of nicotinic acid glucoside. *Plant Physiol Biochem* **49**: 275–9
- Asrar J, Kohn F, Sanders E** (2003) Increasing plant yield by seed treatment with a neonicotinoid compound. WO 2003096811 A1
- Assouline S, Or D** (2013) Plant water use efficiency over geological time--evolution of leaf stomata configurations affecting plant gas exchange. *PLoS One* **8**: e67757
- Atkin OK, Macherel D** (2009) The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Ann Bot* **103**: 581–97
- Avraham T, Badani H, Galili S, Amir R** (2005) Enhanced levels of methionine and cysteine in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants over-expressing the *Arabidopsis* cystathionine gamma-synthase gene. *Plant Biotechnol J* **3**: 71–9
- Babiychuk E, Van Montagu M, Kushnir S** (2001) N-terminal domains of plant poly(ADP-ribose) polymerases define their association with mitotic chromosomes. *Plant J* **28**: 245–55
- Backhausen JE, Emmerlich A, Holtgreffe S, Horton P, Nast G, Rogers JJM, Müller-Röber B, Scheibe R** (1998) Transgenic potato plants with altered expression levels of chloroplast NADP-malate dehydrogenase: interactions between photosynthetic electron transport and malate metabolism in leaves and in isolated intact chloroplasts. *Planta* **207**: 105–114
- Bacon M** (2009) *Water use efficiency in plant biology*. Wiley-Blackwell Ed.
- Baena-González E, Sheen J** (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci* **13**: 474–82

- Baldwin IT, Ohnmeiss TE** (1993) Alkaloidal responses to damage in *Nicotiana* native to North America. *J Chem Ecol* **19**: 1143–53
- Barbour MM** (2007) Stable oxygen isotope composition of plant tissue: a review. *Funct Plant Biol* **34**: 83
- Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodríguez PL, Ponce MR, Micol JL** (2005) A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J Exp Bot* **56**: 2071–83
- Bartsch M, Gobbato E, Bednarek P, Debey S, Schultze JL, Bautor J, Parker JE** (2006) Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in *Arabidopsis* immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the Nudix hydrolase NUDT7. *Plant Cell* **18**: 1038–51
- Baumann L, Baumann P, Moran NA, Sandström J, Thao ML** (1999) Genetic characterization of plasmids containing genes encoding enzymes of leucine biosynthesis in endosymbionts (*Buchnera*) of aphids. *J Mol Evol* **48**: 77–85
- Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubek J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, et al.** (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* **323**: 101–6
- Beerling DJ, Franks PJ** (2009) Evolution of stomatal function in “lower” land plants. *New Phytol* **183**: 921–5
- Belenky P, Stebbins R, Bogan KL, Evans CR, Brenner C** (2011) Nrt1 and Tna1-independent export of NAD⁺ precursor vitamins promotes NAD⁺ homeostasis and allows engineering of vitamin production. *PLoS One* **6**: e19710
- Belhaj K, Lin B, Mauch F** (2009) The chloroplast protein RPH1 plays a role in the immune response of *Arabidopsis* to *Phytophthora brassicae*. *Plant J* **58**: 287–98
- Berger F, Lau C, Dahlmann M, Ziegler M** (2005) Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem* **280**: 36334–41
- Berger F, Ramírez-Hernández MH, Ziegler M** (2004) The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci* **29**: 111–8
- Bernal-Bayard P, Hervás M, Cejudo FJ, Navarro JA** (2012) Electron transfer pathways and dynamics of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC). *J Biol Chem* **287**: 33865–72
- Bernhardt K, Wilkinson S, Weber APM, Linka N** (2012) A peroxisomal carrier delivers NAD⁺ and contributes to optimal fatty acid degradation during storage oil mobilization. *Plant J* **69**: 1–13

- Berrin J-G, Pierrugues O, Brutesco C, Alonso B, Montillet J-L, Roby D, Kazmaier M** (2005) Stress induces the expression of AtNADK-1, a gene encoding a NAD(H) kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **273**: 10–9
- Bessman MJ, Frick DN, O’Handley SF** (1996) The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. *J Biol Chem* **271**: 25059–62
- Bhatia R, Calvo KC** (1996) The sequencing expression, purification, and steady-state kinetic analysis of quinolinate phosphoribosyl transferase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **325**: 270–8
- Bianchi AR, De Maio A** (2014) Synthesis and degradation of poly(ADP-ribose) in plants. *Front Biosci (Landmark Ed)* **19**: 1436–44
- Biemelt S, Tschiersch H, Sonnewald U** (2004) Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* **135**: 254–65
- Billington RA, Bruzzone S, Flora A De, Genazzani AA, Koch-nolte F, Ziegler M, Zocchi E** (2006) Emerging Functions of Extracellular Pyridine Nucleotides. *Mol Med* **12**: 324–327
- De Block M, Hannah M, Van der Kelen K, Van Breusegem F** (2012) A gene expression signature for the selection of high energy use efficient plants. *WO* 2012/041496
- De Block M, Van Lijsebettens M** (2011) Energy efficiency and energy homeostasis as genetic and epigenetic components of plant performance and crop productivity. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 275–82
- De Block M, Verduyn C, De Brouwer D, Cornelissen M** (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance. *Plant J* **41**: 95–106
- Blum A** (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential - are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Aust J Agric Res* **56**: 1159–1168
- Bock R** (2013) Strategies for metabolic pathway engineering with multiple transgenes. *Plant Mol Biol* **83**: 21–31
- Bogan KL, Brenner C** (2008) Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD⁺ precursor vitamins in human nutrition. *Annu Rev Nutr* **28**: 115–30
- Boivin C, Camut S, Malpica CA, Truchet G, Rosenberg C** (1990) *Rhizobium meliloti* Genes Encoding Catabolism of Trigonelline Are Induced under Symbiotic Conditions. *Plant Cell* **2**: 1157–1170

- Bolton MD** (2009) Primary metabolism and plant defense--fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 487–97
- Bonfig KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berger S** (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* **225**: 1–12
- Bonicalzi M-E, Haince J-F, Droit A, Poirier GG** (2005) Regulation of poly(ADP-ribose) metabolism by poly(ADP-ribose) glycohydrolase: where and when? *Cell Mol Life Sci* **62**: 739–50
- De Bont L, Gakière B** (2014) Plantes riches en énergie et rendements en graines élevés. Demande de brevet français N°06561–01 déposé par le CNRS.
- Bonzon M, Simon P, Greppin H, Wagner E** (1983) Pyridine nucleotides and redox-charge evolution during the induction of flowering in spinach leaves. *Planta* **159**: 254–60
- Boshoff HIM, Xu X, Tahlan K, Dowd CS, Pethe K, Camacho LR, Park T-H, Yun C-S, Schnappinger D, Ehrt S, et al** (2008) Biosynthesis and recycling of nicotinamide cofactors in mycobacterium tuberculosis. An essential role for NAD in nonreplicating bacilli. *J Biol Chem* **283**: 19329–41
- Bossi RT, Negri A, Tedeschi G, Mattevi A** (2002) Structure of FAD-bound L-aspartate oxidase: insight into substrate specificity and catalysis. *Biochemistry* **41**: 3018–24
- Bouché N, Fromm H** (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci* **9**: 110–5
- Boyer JS** (1982) Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443–8
- Bowers JE, Chapman BA, Rong J, Paterson AH** (2003) Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* **422**: 433–8
- Brailoiu E, Miyamoto MD, Dun NJ** (2001) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate enhances quantal neurosecretion at the frog neuromuscular junction: possible action on synaptic vesicles in the releasable pool. *Mol Pharmacol* **60**: 718–24
- Bray R** (2013) An experimental study of factors underlying differential ecosystem recovery from acidification of upland waters. *Appl Ecol Exp Res* **11**: 423–439
- Briggs AG, Bent AF** (2011) Poly(ADP-ribosyl)ation in plants. *Trends Plant Sci* **16**: 372–80
- Brown EG** (1965) Changes in the free nucleotide pattern of pea seeds in relation to germination. *Biochem J* **95**: 509–14

- Brown PD, Tokuhsa JG, Reichelt M, Gershenzon J** (2003) Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **62**: 471–81
- Brown S, Devaux P, Marie D, Bergounioux C, Petit P** (1991) Flow-Cytometry - Application to analysis of plant ploidy. *Biofutur* 1991b
- Bruinsma J** (1961) A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochim Biophys Acta* **52**: 576–578
- Bruzzone S, Moreschi I, Guida L, Usai C, Zocchi E, De Flora A** (2006) Extracellular NAD⁺ regulates intracellular calcium levels and induces activation of human granulocytes. *Biochem J* **393**: 697–704
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R** (2000) *Biochemistry & model biology of plants*. Am Soc plant Physiol Rockville, (Wiley-Blackwell Ed.) p. 721
- Buck SW, Gallo CM, Smith JS** (2004) Diversity in the Sir2 family of protein deacetylases. *J Leukoc Biol* **75**: 939–50
- Bürkle A** (2001) Poly(ADP-ribosyl)ation, a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability. *Cancer Lett* **163**: 1–5
- Busch FA, Sage TL, Cousins AB, Sage RF** (2013) C3 plants enhance rates of photosynthesis by reassimilating photorespired and respired CO₂. *Plant Cell Environ* **36**: 200–12
- Bykova N V, Rasmusson AG, Igamberdiev AU, Gardeström P, Møller IM** (1999) Two separate transhydrogenase activities are present in plant mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **265**: 106–11
- Bykova N V., Møller IM** (2001) Involvement of matrix NADP turnover in the oxidation of NAD-linked substrates by pea leaf mitochondria. *Physiol Plant* **111**: 448–456
- Cabrera y Poch HL, Ponz F, Fereres A** (1998) Searching for resistance in *Arabidopsis thaliana* to the green peach aphid *Myzus persicae*. *Plant Sci* **138**: 209–216
- Caiafa P, Guastafierro T, Zampieri M** (2009) Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J* **23**: 672–8
- Calvin M, Benson AA** (1949) The Path of Carbon in Photosynthesis IV: The Identity and Sequence of the Intermediates in Sucrose Synthesis. *Science* **109**: 140–2
- Campbell WJ, Allen LH, Bowes G** (1988) Effects of CO₂ Concentration on Rubisco Activity, Amount, and Photosynthesis in Soybean Leaves. *Plant Physiol* **88**: 1310–6
- Cane KA, Mayer M, Lidgett AJ, Michael AJ, Hamill JD** (2005) Molecular analysis of alkaloid metabolism in AABB v. aabb genotype *Nicotiana tabacum* in

- response to wounding of aerial tissues and methyl jasmonate treatment of cultured roots. *Funct Plant Biol* **32**: 305
- Canepa L, Ferraris AM, Miglino M, Gaetani GF** (1991) Bound and unbound pyridine dinucleotides in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1074**: 101–104
- Cárdenas L** (2009) New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells. *Plant Signal Behav* **4**: 4–8
- Cárdenas L, Martínez A, Sánchez F, Quinto C** (2008) Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J* **56**: 802–13
- Cárdenas L, McKenna ST, Kunkel JG, Hepler PK** (2006) NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth. *Plant Physiol* **142**: 1460–8
- Catala R, Ouyang J, Abreu IA, Hu Y, Seo H, Zhang X, Chua N-H** (2007) The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *Plant Cell* **19**: 2952–66
- Cataldo D, Haroon L, Schrader L, Youngs V** (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun Soil Sci Plant Anal* **6**: 71–80
- Centeno DC, Osorio S, Nunes-Nesi A, Bertolo ALF, Carneiro RT, Araújo WL, Steinhauser M-C, Michalska J, Rohrmann J, Geigenberger P, et al** (2011) Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *Plant Cell* **23**: 162–84
- Chaerle L, Saibo N, Straeten D Van Der** (2005) Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends Biotechnol.*
- Chai M-F, Chen Q-J, An R, Chen Y-M, Chen J, Wang X-C** (2005) NADK2, an Arabidopsis chloroplastic NAD kinase, plays a vital role in both chlorophyll synthesis and chloroplast protection. *Plant Mol Biol* **59**: 553–64
- Chai M-F, Wei P-C, Chen Q-J, An R, Chen J, Yang S, Wang X-C** (2006) NADK3, a novel cytoplasmic source of NADPH, is required under conditions of oxidative stress and modulates abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant J* **47**: 665–74
- Chaouch S, Queval G, Noctor G** (2012) AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in Arabidopsis. *Plant J* **69**: 613–27
- Chappie JS, Cànaves JM, Han GW, Rife CL, Xu Q, Stevens RC** (2005) The structure of a eukaryotic nicotinic acid phosphoribosyltransferase reveals structural heterogeneity among type II PRTases. *Structure* **13**: 1385–96

- Chen C, Dickman MB** (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3459–64
- Chen X, Wood AJ** (2004) Purification and Characterization of S-Adenosyl-L-Methionine Nicotinic Acid-N-Methyltransferase from Leaves of *Glycine max*. *Biol Plant* **48**: 531–535
- Cheniclet C, Rong WY, Causse M, Frangne N, Bolling L, Carde J-P, Renaudin J-P** (2005) Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol* **139**: 1984–94
- Chini EN, Chini CCS, Kato I, Takasawa S, Okamoto H** (2002) CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. *Biochem J* **362**: 125–30
- Chini EN, De Toledo FGS** (2002) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate: a new intracellular second messenger? *Am J Physiol Cell Physiol* **282**: C1191–8
- Chollet R** (1976) Effect of glycidate on glycolate formation and photosynthesis in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol* **57**: 237–40
- Chung PJ, Kim YS, Park S-H, Nahm BH, Kim J-K** (2009) Subcellular localization of rice histone deacetylases in organelles. *FEBS Lett* **583**: 2249–54
- Cicchillo RM, Tu L, Stromberg JA, Hoffart LM, Krebs C, Booker SJ** (2005) *Escherichia coli* quinolinate synthetase does indeed harbor a [4Fe-4S] cluster. *J Am Chem Soc* **127**: 7310–1
- Clark RB** (1969) Organic acids from leaves of several crop plants by gas chromatography. *Crop Sci.* 9:341-343
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM** (2009) Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* **323**: 95–101
- Clough SJ, Bent a F** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–43
- Colinas M, Shaw H V, Loubéry S, Kaufmann M, Moulin M, Fitzpatrick TB** (2014) A Pathway for Repair of NAD(P)H in Plants. *J Biol Chem* **289**: 14692–706
- Come D** (1970) Les obstacles à la germination. Ed Masson Cie 162 p.
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD** (2004) Breeding for high water-use efficiency. *J Exp Bot* **55**: 2447–60
- Constantin J, Delaveau P** (2010) Café, thé, chocolat. Les bienfaits pour le cerveau et le corps. Ed Odile Jacob **1**: 270 p.

- Contreras JE, Sáez JC, Bukauskas FF, Bennett MVL** (2003) Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11388–93
- Cormier MJ, Charbonneau H, Jarrett HW** (1981) Plant and fungal calmodulin: Ca²⁺-dependent regulation of plant NAD kinase. *Cell Calcium* **2**: 313–31
- Cossins EA, Kirk CD, Imeson HC, Zheng LL** (1993) Enzymes for synthesis of 10-formyltetrahydrofolate in plants. Characterization of a monofunctional 10-formyltetrahydrofolate synthetase and copurification of 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase and 5,10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase act. *Adv Exp Med Biol* **338**: 707–10
- D'Ari R, Casadesús J** (1998) Underground metabolism. *Bioessays* **20**: 181–6
- Dahmen W, Webb B, Preiss J** (1967) The deamido-diphosphopyridine nucleotide and diphosphopyridine nucleotide pyrophosphorylases of *Escherichia coli* and yeast. *Arch Biochem Biophys* **120**: 440–450
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D** (1999) Overexpression of Arabidopsis Hexokinase in Tomato Plants Inhibits Growth, Reduces Photosynthesis, and Induces Rapid Senescence. *Plant Cell* **11**: 1253
- Dai Z, Ku M, Edwards GE** (1995) C₄ Photosynthesis (The Effects of Leaf Development on the CO₂-Concentrating Mechanism and Photorespiration in Maize). *Plant Physiol* **107**: 815–825
- Dangl JF, Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**:826-33
- David P, Chen NWG, Pedrosa-Harand A, Thareau V, Sévignac M, Cannon SB, Debouck D, Langin T, Geffroy V** (2009) A nomadic subtelomeric disease resistance gene cluster in common bean. *Plant Physiol* **151**: 1048–65
- Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, Poirier GG** (2001) Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* **268**: 7–13
- Dawson R, Elliott D, Elliott W, Jones K** (1987) *Data for Biochemical Research* -. Oxford Univ. Press - 3rd Ed.
- Day DA, Wiskich JT** (1981) Glycine metabolism and oxalacetate transport by pea leaf mitochondria. *Plant Physiol* **68**: 425–9
- Denk W, Strickler JH, Webb WW** (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**: 73–6
- Dennis DT, Huang Y, Negm FB** (1997) Glycolysis, the oxidative pentose phosphate pathway and anaerobic respiration. *Plant Metab eds D.T. D*: 105

- Dever L, Bailey K, Lacuesta M, Leegood R, Lea P** (1996) The isolation and characterization of mutants of the C-4 plant *Amaranthus edulis*. *Comptes rendus Acad. Sci. III. La Vie* **319**: 951–959
- Dewey RE, Xie J** (2013) Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **94**: 10–27
- Dieter P, Marmé D** (1984) A Ca²⁺, Calmodulin-dependent NAD kinase from corn is located in the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **259**: 184–9
- Divi UK, Krishna P** (2009) Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *N Biotechnol* **26**: 131–6
- Dobrota C** (2006) Energy dependent plant stress acclimation. *Rev Env Sci Biotechnol* **5**: 243–251
- Dobrzanska M, Szurmak B, Wyslouch-Cieszynska A, Kraszewska E** (2002) Cloning and characterization of the first member of the Nudix family from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **277**: 50482–6
- Doheny-Adams T, Hunt L, Franks PJ, Beerling DJ, Gray JE** (2012) Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**: 547–55
- Dong S, Yin W, Kong G, Yang X, Qutob D, Chen Q, Kale SD, Sui Y, Zhang Z, Dou D, et al.** (2011) *Phytophthora sojae* avirulence effector Avr3b is a secreted NADH and ADP-ribose pyrophosphorylase that modulates plant immunity. *PLoS Pathog* **7**: e1002353
- Doubnerová V, Ryšlavá H** (2011) What can enzymes of C4 photosynthesis do for C3 plants under stress? *Plant Sci* **180**: 575–83
- Douce R, Neuburger M** (1989) The Uniqueness of Plant Mitochondria. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 371–414
- Doucet-Chabeaud G, Godon C, Brutesco C, de Murcia G, Kazmaier M** (2001) Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics* **265**: 954–63
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127–45
- Du W, Ren S, Suo Q, Yang M, He D, Liu J** (2011) Construction of Sirt1 shRNA interfering vector and its effects on cell proliferation and apoptosis. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* **28**: 972–5
- Du X, Wang W, Kim R, Yakota H, Nguyen H, Kim SH** (2001) Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*, **40**: 14166–72

- Dutilleul C, Driscoll S, Cornic G, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G (2003a)** Functional mitochondrial complex I is required by tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiol* **131**: 264–75
- Dutilleul C, Garmier M, Noctor G, Mathieu C, Chétrit P, Foyer C, De Paepe R (2003b)** Leaf Mitochondria Modulate Whole Cell Redox Homeostasis, Set Antioxidant Capacity, and Determine Stress Resistance through Altered Signaling and Diurnal Regulation. *Plant Cell* **15**: 1212–1226
- Dutilleul C, Lelarge C, Prioul J-L, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G (2005)** Mitochondria-driven changes in leaf NAD status exert a crucial influence on the control of nitrate assimilation and the integration of carbon and nitrogen metabolism. *Plant Physiol* **139**: 64–78
- Ehdaie B, Hall A, Farquhar G, Nguyen H, Waines J (1991)** Water-use efficiency and carbon isotope discrimination in wheat. *Crop Sci* **31**: 1282–1288
- Ekkehard H, Stitt M (1989)** Perturbation of photosynthesis in spinach leaf discs by low concentrations of methyl viologen: Influence of increased thylakoid energisation on ATP synthesis, electron transport, energy dissipation, light-activation of the calvin-cycle enzymes, and contr. *Planta* **179**: 51–60
- El-Maarouf-Bouteau H, Sajjad Y, Bazin J, Langlade N, Cristescu SM, Balzergue S, Baudouin E, Bailly C (2014)** Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.12371
- Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T (2000)** Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat Biotechnol* **18**: 784–8
- Escobar MA, Geisler DA, Rasmusson AG (2006)** Reorganization of the alternative pathways of the Arabidopsis respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. *Plant J* **45**: 775–88
- Von Euler HKAS (1930)** Fermentation of sugars and fermentative enzymes. *Nobel Lect Nobel Foun*: Stockholm, Suède
- Evans LS, Almeida MS, Lynn DG, Nakanishi K (1979)** Chemical characterization of a hormone that promotes cell arrest in g₂ in complex tissues. *Science* **203**: 1122–3
- Evans LS, Tramontano WA (1981)** Is Trigonelline a Plant Hormone? *Am J Bot* **68**: 1282
- Evenari M, Koller D, Gutteman Y (1966)** Effects of the environment of the mother plants on the germination by control of seed-coat permeability to water in *Ononis sicula*. *Aust J Biol Sci* **19**: 1007–1016

- Fagard M, Dellagi A, Roux C, Périno C, Rigault M, Boucher V, Shevchik VE, Expert D** (2007) *Arabidopsis thaliana* expresses multiple lines of defense to counterattack *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 794–805
- Fan J, Ye J, Kamphorst JJ, Shlomi T, Thompson CB, Rabinowitz JD** (2014) Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* **510**: 298–302
- Farquhar GD** (1998) Interpretation of oxygen isotope composition of leaf material. 27 – 62
- Farquhar GD, O’Leary MH, Berry JA** (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust J Plant Physiol* **9**: 121–137
- Faure J-D, Vincentz M, Kronenberger J, Caboche M** (1991) Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases. *Plant J* **1**: 107–113
- Feth F, Wagner R, Wagner KG** (1986) Regulation in tobacco callus of enzyme activities of the nicotine pathway: I. The route ornithine to methylpyrroline. *Planta* **168**: 402–7
- Finkemeier I, Laxa M, Miguet L, Howden AJM, Sweetlove LJ** (2011) Proteins of diverse function and subcellular location are lysine acetylated in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **155**: 1779–90
- Fjeld CC, Birdsong WT, Goodman RH** (2003) Differential binding of NAD⁺ and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9202–7
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, et al** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442–6
- Foster AC, Zinkand WC, Schwarcz R** (1985) Quinolinic acid phosphoribosyltransferase in rat brain. *J Neurochem* **44**: 446–54
- Fournier H** (2003) *Chroniques de la vie sur Terre pendant quatre milliards d.* Ed Publib 1–124
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2009) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 455–84
- Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J** (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* **63**: 1637–61

- Foyer CH, Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866–75
- Friedkin M, Lehninger AL** (1949) Esterification of inorganic phosphate coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. *J Biol Chem* **178**: 611–44
- Frost GM, Yang KS, Waller GR** (1967) Nicotinamide adenine dinucleotide as a precursor of nicotine in *Nicotiana rustica* L. *J Biol Chem* **242**: 887–8
- Fryer MJ, Ball L, Oxborough K, Karpinski S, Mullineaux PM, Baker NR** (2003) Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **33**: 691–705
- Fu ZQ, Dong X** (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 839–63
- Galeeva EI, Trifonova T V, Ponomareva AA, Viktorova L V, Minibayeva F V** (2012) Nitrate reductase from *Triticum aestivum* leaves: regulation of activity and possible role in production of nitric oxide. *Biochem Biokhimiia* **77**: 404–10
- Gallais S, de Crescenzo MA, Laval-Martin DL** (2000) Evidence of active NADP(+) phosphatase in dormant seeds of *Avena sativa* L. *J Exp Bot* **51**: 1389–94
- Gallais S, Pou De Crescenzo MA, Laval-Martin DL** (1998) Pyridine nucleotides and redox charges during germination of non-dormant and dormant caryopses of *Avena sativa* L. *J Plant Physiol* **153**: 663–669
- Galletti R, Denoux C, Gambetta S, Dewdney J, Ausubel FM, De Lorenzo G, Ferrari S** (2008) The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **148**: 1695–706
- Gálvez S, Lancien M, Hodges M** (1999) Are isocitrate dehydrogenases and 2-oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis? *Trends Plant Sci* **4**: 484–490
- Galvez-Valdivieso G, Fryer MJ, Lawson T, Slattery K, Truman W, Smirnov N, Asami T, Davies WJ, Jones AM, Baker NR, et al** (2009) The high light response in *Arabidopsis* involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells. *Plant Cell* **21**: 2143–62
- Gardeström P** (1987) Adenylate ratios in the cytosol, chloroplasts and mitochondria of barley leaf protoplasts during photosynthesis at different carbon dioxide concentrations. *FEBS Lett* **212**: 114–118
- Gardner PR, Fridovich I** (1991) Quinolinate synthetase: The oxygen-sensitive site of de novo NAD(P)+ biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **284**: 106–111

- Gauthier PPG, Bligny R, Gout E, Mahé A, Nogués S, Hodges M, Tcherkez GGB** (2010) In folio isotopic tracing demonstrates that nitrogen assimilation into glutamate is mostly independent from current CO₂ assimilation in illuminated leaves of *Brassica napus*. *New Phytol* **185**: 988–99
- Ge X, Li G-J, Wang S-B, Zhu H, Zhu T, Wang X, Xia Y** (2007) AtNUDT7, a negative regulator of basal immunity in *Arabidopsis*, modulates two distinct defense response pathways and is involved in maintaining redox homeostasis. *Plant Physiol* **145**: 204–15
- Ge X, Xia Y** (2008) The role of AtNUDT7, a Nudix hydrolase, in the plant defense response. *Plant Signal Behav* **3**: 119–20
- Geigenberger P, Fernie AR** (2014) Metabolic Control of Redox and Redox Control of Metabolism in Plants. *Antioxid Redox Signal*. doi: 10.1089/ars.2014.6018
- Genazzani AA, Bak J, Galione A** (1996) Inhibition of cADPR-Hydrolase by ADP-ribose potentiates cADPR synthesis from beta-NAD⁺. *Biochem Biophys Res Commun* **223**: 502–7
- Gerdes SY, Kurnasov O V, Shatalin K, Polanuyer B, Sloutsky R, Vonstein V, Overbeek R, Osterman AL** (2006) Comparative genomics of NAD biosynthesis in cyanobacteria. *J Bacteriol* **188**: 3012–23
- Gibson SW, Conway AJ, Zheng Z, Uchacz TM, Taylor JL, Todd CD** (2012) *Brassica carinata* CIL1 mediates extracellular ROS production during auxin- and ABA-regulated lateral root development. *J Plant Biol* **55**: 361–372
- Giegé P, Heazlewood JL, Roessner-Tunali U, Millar AH, Fernie AR, Leaver CJ, Sweetlove LJ** (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **15**: 2140–51
- Glazebrook J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205–27
- Glazebrook J, Ausubel FM** (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8955–9
- Golubev AG** (1996) The other side of metabolism. *Biokhimiia* (Moscow, Russ) **61**: 2018–39
- Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Antoni R, Vera-Sirera F, Merilo E, Bassel GW, Fernández MA, Holdsworth MJ, Perez-Amador MA, Kollist H, et al** (2012) *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell* **24**: 2483–96
- Gordon SA, Fleck A, Bell J** (1978) Optimal conditions for the estimation of ammonium by the Berthelot reaction. *Ann Clin Biochem* **15**: 270–5

- Govrin EM, Levine A** (2002) Infection of Arabidopsis with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Mol Biol* **48**: 267–76
- Graeff RM, Lee HC** (2013) Determination of ADP-ribosyl cyclase activity, cyclic ADP-ribose, and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate in tissue extracts. *Methods Mol Biol* **1016**: 39–56
- Graham IA** (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 115–42
- Graham JWA, Williams TCR, Morgan M, Fernie AR, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ** (2007) Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell* **19**: 3723–38
- Granot D, David-Schwartz R, Kelly G** (2013) Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Front Plant Sci* **4**: 44
- Greiss S, Gartner A** (2009) Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. *Mol Cells* **28**: 407–15
- Griffith GR, Chandler JL, Gholson R** (1975) Studies on the de novo Biosynthesis of NAD in *Escherichia coli* The separation of the *nadB* gene product from the *nadA* product and its purification. *Eur J Biochem* **54**: 239–245
- Guérard F, Pétriacq P, Gakière B, Tcherkez G** (2011) Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the analysis of plant samples: a method for simultaneous screening of common cofactors or nucleotides and application to an engineered plant line. *Plant Physiol Biochem* **49**: 1117–25
- Gunawardana D, Cheng H-C, Gayler KR** (2008) Identification of functional domains in *Arabidopsis thaliana* mRNA decapping enzyme (*AtDcp2*). *Nucleic Acids Res* **36**: 203–16
- Guse AH, Lee HC** (2008) NAADP: a universal Ca²⁺ trigger. *Sci Signal* **1**: re10
- Gutschick V, Simonneau T** (2002) Modeling stomatal conductance of field-grown sunflower under varying soil water content and leaf environment: comparison of three models of stomatal response to leaf environment and coupling with an ABA-based model of stomatal response to soil drying. *Plant Cell Environ* **25**: 1423–1434
- Ha HC, Snyder SH** (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13978–82
- Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP** (2012) Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends Plant Sci* **17**: 172–9
- Hagedorn PH, Flyvbjerg H, Møller IM** (2004) Modelling NADH turnover in plant mitochondria. *Physiol Plant* **120**: 370–385

- Hager J, Pellny TK, Mauve C, Lelarge-Trouverie C, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G** (2010) Conditional modulation of NAD levels and metabolite profiles in *Nicotiana glauca* by mitochondrial electron transport and carbon/nitrogen supply. *Planta* **231**: 1145–57
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, et al** (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* **126**: 941–54
- Hain R, Berg D, Peterhansel C, Kreuzaler F, Bari R, Weier D, Hirsch H-J, Rademacher T** (2006) Transformation of a C3 plant cell with one or more nucleic acids encoding glycolate oxidase, glycolate dehydrogenase, glyoxylate carboligase, or tartronic semialdehyde reductase; transgenic plants, tissues, and cells. US20060095981 A1
- Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P** (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* **25**: 989–94
- Hammond-Kosack KE, Parker JE** (2003) Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 177–193
- Hanning I, Heldt HW** (1993) On the Function of Mitochondrial Metabolism during Photosynthesis in Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaves (Partitioning between Respiration and Export of Redox Equivalents and Precursors for Nitrate Assimilation Products). *Plant Physiol* **103**: 1147–1154
- Hara N, Yamada K, Shibata T, Osago H, Hashimoto T, Tsuchiya M** (2007) Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells. *J Biol Chem* **282**: 24574–82
- Harden AD, Young WJM** (1906) The alcoholic ferment of yeast-juice Part II.--The coferment of yeast-juice. *Proc R Soc London Ser B, Contain Pap a Biol Character* **78**: 369–375
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S** (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2122–7
- Hashida S, Itami T, Takahashi H, Takahara K, Nagano M, Kawai-Yamada M, Shoji K, Goto F, Yoshihara T, Uchimiya H** (2010) Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **61**: 3813–25
- Hashida S, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H** (2007) *Arabidopsis thaliana* nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (AtNMNAT) is required for pollen tube growth. *Plant J* **49**: 694–703

- Hashida S, Takahashi H, Takahara K, Kawai-Yamada M, Kitazaki K, Shoji K, Goto F, Yoshihara T, Uchimiya H** (2013) NAD⁺ accumulation during pollen maturation in Arabidopsis regulating onset of germination. *Mol Plant* **6**: 216–25
- Hashida S, Takahashi H, Uchimiya H** (2009a) The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Ann Bot* **103**: 819–24
- Hashida S, Takahashi H, Uchimiya H** (2009b) The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Ann Bot* **103**: 819–24
- Hashida S-N, Kawai-Yamada M, Uchimiya H** (2013c) NAD⁺ accumulation as a metabolic off switch for orthodox pollen. *Plant Signal Behav* **8**: 1–3
- Hashida S-N, Takahashi H, Takahara K, Kawai-Yamada M, Kitazaki K, Shoji K, Goto F, Yoshihara T, Uchimiya H** (2013c) NAD⁺ Accumulation during Pollen Maturation in Arabidopsis Regulating Onset of Germination. *Mol Plant* **6**: 216–25
- Hauben M, Haesendonckx B, Standaert E, Van Der Kelen K, Azmi A, Akpo H, Van Breusegem F, Guisez Y, Bots M, Lambert B, et al** (2009) Energy use efficiency is characterized by an epigenetic component that can be directed through artificial selection to increase yield. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 20109–14
- Havlová M, Dobrev PI, Motyka V, Storchová H, Libus J, Dobrá J, Malbeck J, Gaudinová A, Vanková R** (2008) The role of cytokinins in responses to water deficit in tobacco plants over-expressing trans-zeatin O-glucosyltransferase gene under 35S or SAG12 promoters. *Plant Cell Environ* **31**: 341–53
- Hayakawa T, Nakamura T, Hattori F, Mae T, Ojima K, Yamaya T** (1994) Cellular localization of NADH-dependent glutamate-synthase protein in vascular bundles of unexpanded leaf blades and young grains of rice plants. *Planta* **193**:455-60
- Hayashi M, Takahashi H, Tamura K, Huang J, Yu L-H, Kawai-Yamada M, Tezuka T, Uchimiya H** (2005) Enhanced dihydroflavonol-4-reductase activity and NAD homeostasis leading to cell death tolerance in transgenic rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7020–5
- Heber UW, Santarius KA** (1965) Compartmentation and reduction of pyridine nucleotides in relation to photosynthesis. *Biochim Biophys Acta - Biophys Incl Photosynth* **109**: 390–408
- Hedrich R, Marten I** (1993) Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells. *EMBO J* **12**: 897–901
- Heeger V, Leienbach KW, Barz W** (1976) [Metabolism of nicotinic acid in plant cell suspension cultures, III: Formation and metabolism of trigonelline (author's transl)]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **357**: 1081–7

- Heineke D, Riens B, Grosse H, Hoferichter P, Peter U, Flügge UI, Heldt HW** (1991) Redox Transfer across the Inner Chloroplast Envelope Membrane. *Plant Physiol* **95**: 1131–7
- Henderson LM, Someroski JF, Rao DR, Wu PHL, Griffith T, Byerrum RU** (1959) Lack of tryptophan-niacin relationship in corn and tobacco. *J Biol Chem* **234**: 93–5
- Heyno E, Innocenti G, Lemaire SD, Issakidis-Bourguet E, Krieger-Liszkay A** (2014) Putative role of the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase in H₂O₂ signalling in Arabidopsis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**: 20130228
- Hildreth SB, Gehman EA, Yang H, Lu R-H, Ritesh KC, Harich KC, Yu S, Lin J, Sandoe JL, Okumoto S, et al** (2011) Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 18179–84
- Hirakawa Y, Shinohara H, Kondo Y, Inoue A, Nakanomyo I, Ogawa M, Sawa S, Ohashi-Ito K, Matsubayashi Y, Fukuda H** (2008) Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15208–13
- Hirel B, Lea PJ** (2002) The biochemistry, molecular biology and genetic manipulation of primary ammonia assimilation. *Kluwer Acad Publ* 71–92
- Hoagland D** (1920) Optimum nutrient solutions for plants. *Science* (80-) **52**: 193–194
- Holfelder M, Steck M, Komor E, Seifert K** (1998) Ricinine in phloem sap of *Ricinus communis*. *Phytochemistry* **47**: 1461–1463
- Hollender C, Liu Z** (2008) Histone deacetylase genes in Arabidopsis development. *J Integr Plant Biol* **50**: 875–85
- Hosokawa Y, Mitchell E, Gholson R** (1983) Higher plants contain L-asparatase oxidase, the first enzyme of the Escherichia coli quinolinate synthetase system. *Biochem Biophys Res Commun* **111**: 188–93
- Hou Q, Bartels D** (2014) Comparative study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in the glycophyte Arabidopsis thaliana and Eutrema halophytes. *Ann Bot.* doi: 10.1093/aob/mcu152
- Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J** (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 225–38
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P** (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* **2008**: 420747

- Hu Q, Chen C, Yan J, Yang X, Shi X, Zhao J, Lei J, Yang L, Wang K, Chen L, et al** (2009) Therapeutic application of gene silencing MMP-9 in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia rat model. *Exp Neurol* **216**: 35–46
- Hu Y, Poh HM, Chua N-H** (2006) The Arabidopsis ARGOS-LIKE gene regulates cell expansion during organ growth. *Plant J* **47**: 1–9
- Hu Y, Xie Q, Chua N-H** (2003) The Arabidopsis auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size. *Plant Cell* **15**: 1951–61
- Hua J** (2013) Modulation of plant immunity by light, circadian rhythm, and temperature. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 406–13
- Huang H, Tindall DJ** (2007) Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* **120**: 2479–87
- Huang L, Sun Q, Qin F, Li C, Zhao Y, Zhou D-X** (2007) Down-regulation of a SILENT INFORMATION REGULATOR2-related histone deacetylase gene, OsSRT1, induces DNA fragmentation and cell death in rice. *Plant Physiol* **144**: 1508–19
- Huber A, Bai P, de Murcia JM, de Murcia G** (2004) PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1103–8
- Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteillé M, Stitt M, et al.** (2010) Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol* **154**: 357–72
- Hummel W, Gröger H** (2014) Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems. *J Biotechnol.* doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.449
- Hunt L, Gray JE** (2009) The relationship between pyridine nucleotides and seed dormancy. *New Phytol* **181**: 62–70
- Hunt L, Holdsworth MJ, Gray JE** (2007) Nicotinamidase activity is important for germination. *Plant J* **51**: 341–51
- Hunt L, Lerner F, Ziegler M** (2004) NAD - new roles in signalling and gene regulation in plants. *New Phytol* **163**: 31–44
- Hura T, Hura K, Grzesiak S** (2009) Possible contribution of cell-wall-bound ferulic acid in drought resistance and recovery in triticale seedlings. *J Plant Physiol* **166**: 1720–33
- Hwang I, Sheen J** (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature* **413**: 383–9

- Igamberdiev AU, Bykova N V, Gardeström P** (1997) Involvement of cyanide-resistant and rotenone-insensitive pathways of mitochondrial electron transport during oxidation of glycine in higher plants. *FEBS Lett* **412**: 265–9
- Igamberdiev AU, Gardeström P** (2003) Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochim Biophys Acta* **1606**: 117–25
- Ikemeyer D, Barz W** (1989) Comparison of secondary product accumulation in photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic *Nicotiana tabacum* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* **8**: 479–82
- Imai S-I** (2010) A possibility of nutraceuticals as an anti-aging intervention: activation of sirtuins by promoting mammalian NAD biosynthesis. *Pharmacol Res* **62**: 42–7
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L** (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**: 795–800
- Imai S-I, Guarente L** (2014) NAD(+) and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol* **24**: 464–471
- De Ingeniis J, Kazanov MD, Shatalin K, Gelfand MS, Osterman AL, Sorci L** (2012) Glutamine versus ammonia utilization in the NAD synthetase family. *PLoS One* **7**: e39115
- Ishikawa K, Yoshimura K, Harada K, Fukusaki E, Ogawa T, Tamoi M, Shigeoka S** (2010) AtNUDX6, an ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase in *Arabidopsis*, positively regulates NPR1-dependent salicylic acid signaling. *Plant Physiol* **152**: 2000–12
- Ito Y, Nakanomyo I, Motose H, Iwamoto K, Sawa S, Dohmae N, Fukuda H** (2006) Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* **313**: 842–5
- Ittersum M van, Cassman K, Grassini P** (2013) Yield gap analysis with local to global relevance—a review. *F. Crop. Res.* **143**: 4-17
- Ivanov B, Khorobrykh S** (2003) Participation of photosynthetic electron transport in production and scavenging of reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* **5**: 43–53
- Jahns E** (1885) Ueber die Alkaloide des Bockshornsamens. *Ber Dtsch Chem Ges* **18**: 2518–2523
- Jamai A, Salomé PA, Schilling SH, Weber APM, McClung CR** (2009) *Arabidopsis* photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Plant Cell* **21**: 595–606

- Jambunathan N, Mahalingam R** (2006) Analysis of Arabidopsis growth factor gene 1 (GFG1) encoding a nudix hydrolase during oxidative signaling. *Planta* **224**: 1–11
- Jambunathan N, Penaganti A, Tang Y, Mahalingam R** (2010) Modulation of redox homeostasis under suboptimal conditions by Arabidopsis nudix hydrolase 7. *BMC Plant Biol* **10**: 173
- Janacek SH, Trenkamp S, Palmer B, Brown NJ, Parsley K, Stanley S, Astley HM, Rolfe SA, Paul Quick W, Fernie AR, et al.** (2009) Photosynthesis in cells around veins of the C(3) plant Arabidopsis thaliana is important for both the shikimate pathway and leaf senescence as well as contributing to plant fitness. *Plant J* **59**: 329–43
- Jang I-C, Chung PJ, Hemmes H, Jung C, Chua N-H** (2011) Rapid and reversible light-mediated chromatin modifications of Arabidopsis phytochrome A locus. *Plant Cell* **23**: 459–70
- Jeanguenin L, Lara-Núñez A, Rodionov DA, Osterman AL, Komarova NY, Rentsch D, Gregory JF, Hanson AD** (2012) Comparative genomics and functional analysis of the NiaP family uncover nicotinate transporters from bacteria, plants, and mammals. *Funct Integr Genomics* **12**: 25–34
- Johnson R, Waller G** (1974) Relationship of pyridine nucleotide cycle to ricinine biosynthesis in *Ricinus communis*. **13**: 1493–1500
- Jones H** (1998) Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.* **49**: 387–398
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–9
- Jones MB, Leafe EL, Stiles W** (1980) Water stress in field-grown perennial ryegrass.. *Ann Appl Biol* **96**: 103–110
- Joshi JG, Handler P** (1960) Biosynthesis of trigonelline. *J Biol Chem* **235**: 2981–3
- Journet EP, Neuburger M, Douce R** (1981) Role of Glutamate-oxaloacetate Transaminase and Malate Dehydrogenase in the Regeneration of NAD for Glycine Oxidation by Spinach leaf Mitochondria. *Plant Physiol* **67**: 467–9
- Kaiser WM, Kandlbinder A, Stoimenova M, Glaab J** (2000) Discrepancy between nitrate reduction rates in intact leaves and nitrate reductase activity in leaf extracts: what limits nitrate reduction in situ? *Planta* **210**: 801–7
- Kaiser WM, Stoimenova M, Man H-M** (2002) What limits nitrate reduction in leaves? CH Foyer, G Noctor, eds, *Photosynth Nitrogen Assimilation Assoc Carbon Respir Metab Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic publishers* **12**: 63–70

- Kang J, Hwang J-U, Lee M, Kim Y-Y, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y** (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2355–60
- Kasimova MR, Grigiene J, Krab K, Hagedorn PH, Flyvbjerg H, Andersen PE, Møller IM** (2006) The Free NADH Concentration Is Kept Constant in Plant Mitochondria under Different Metabolic Conditions. *Plant Cell* **18**: 688–698
- Katagiri F, Thilmony R, He SY** (2002) The Arabidopsis thaliana-pseudomonas syringae interaction. *Arabidopsis Book* **1**: e0039
- Katahira R, Ashihara H** (2009) Profiles of the biosynthesis and metabolism of pyridine nucleotides in potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Planta* **231**: 35–45
- Kato M, Lin S-J** (2014) Regulation of NAD⁺ metabolism, signaling and compartmentalization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.07.009
- Katoh A, Hashimoto T** (2004) Molecular biology of pyridine nucleotide and nicotine biosynthesis. *Front Biosci* **9**: 1577–86
- Katoh A, Uenohara K, Akita M, Hashimoto T** (2006) Early Steps in the Biosynthesis of NAD in Arabidopsis Start with Aspartate and Occur in the Plastid 1. *Plant Physiol* **141**: 851–857
- Kauny J, Sétif P** (2014) NADPH fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: a versatile probe for in vivo measurements of rates, yields and pools. *Biochim Biophys Acta* **1837**: 792–801
- Kawai S, Mori S, Mukai T, Murata K** (2004) Cytosolic NADP phosphatases I and II from *Arthrobacter* sp. strain KM: implication in regulation of NAD⁺/NADP⁺ balance. *J Basic Microbiol* **44**: 185–96
- Kawai S, Murata K** (2008) Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD(H) and NADP(H). *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 919–30
- Kaya H, Nakajima R, Iwano M, Kanaoka MM, 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**: 1069–80
- Kebeish R, Niessen M, Thiruveedhi K, Bari R, Hirsch H-J, Rosenkranz R, Stähler N, Schönfeld B, Kreuzaler F, Peterhänsel C** (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in Arabidopsis thaliana. *Nat Biotechnol* **25**: 593–9
- Keeling CI, Henderson H, Li M, Dullat HK, Ohnishi T, Bohlmann J** (2013) CYP345E2, an antenna-specific cytochrome P450 from the mountain pine

- beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, catalyses the oxidation of pine host monoterpene volatiles. *Insect Biochem Mol Biol* **43**: 1142–51
- Keller J, Liersch M, Grunicke H** (1971) Studies on the biosynthesis of NAD from nicotinamide and on the intracellular pyridine nucleotide cycle in isolated perfused rat liver. *Eur J Biochem* **22**: 263–70
- Kelly G, David-Schwartz R, Sade N, Moshelion M, Levi A, Alchanatis V, Granot D** (2012) The pitfalls of transgenic selection and new roles of AtHXK1: a high level of AtHXK1 expression uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from exogenous sugar. *Plant Physiol* **159**: 47–51
- Keys AJ, Bird LF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrove RM, Mifflin BJ** (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* **275**: 741–743
- Kiba T, Feria-Bourrellier A-B, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H, et al.** (2012) The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell* **24**: 245–58
- Kilfoil PJ, Tipparaju SM, Barski OA, Bhatnagar A** (2013) Regulation of ion channels by pyridine nucleotides. *Circ Res.* **112**(4):832-41
- Kim J-W, Dang C V** (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* **30**: 142–50
- Kim JH, Jander G** (2007) *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on *Arabidopsis* induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. *Plant J* **49**: 1008–19
- Kim JH, Lee BW, Schroeder FC, Jander G** (2008) Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *Myzus persicae* (green peach aphid). *Plant J* **54**: 1015–26
- Kim S-H, Kim S-H, Yoo S-J, Min K-H, Nam S-H, Cho BH, Yang K-Y** (2013) Putrescine regulating by stress-responsive MAPK cascade contributes to bacterial pathogen defense in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* **437**: 502–8
- Kirk CD, Chen L, Imeson HC, Cossins EA** (1995) A 5, 10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase: 5, 10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase protein from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **39**: 1309–1314
- Klaus SMJ, Wegkamp A, Sybesma W, Hugenholtz J, Gregory JF, Hanson AD** (2005) A nudix enzyme removes pyrophosphate from dihydroneopterin triphosphate in the folate synthesis pathway of bacteria and plants. *J Biol Chem* **280**: 5274–80

- Kleessen S, Laitinen R, Fusari CM, Antonio C, Sulpice R, Fernie AR, Stitt M, Nikoloski Z** (2014) Metabolic efficiency underpins performance trade-offs in growth of *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* **5**: 3537
- Kliebenstein DJ, Kroymann J, Mitchell-Olds T** (2005) The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 264–71
- Kocsy G, Tari I, Vanková R, Zechmann B, Gulyás Z, Poór P, Galiba G** (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Sci* **211**: 77–91
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *MGG Mol Gen Genet* **204**: 383–396
- Kong Y, Liu X-P, Wan P-J, Shi X-Q, Guo W-C, Li G-Q** (2014) The P450 enzyme Shade mediates the hydroxylation of ecdysone to 20-hydroxyecdysone in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Mol Biol*. doi: 10.1111/imb.12115
- König A-C, Hartl M, Pham PA, Laxa M, Boersema PJ, Orwat A, Kalitventseva I, Plöchinger M, Braun H-P, Leister D, et al** (2014) The *Arabidopsis* class II sirtuin is a lysine deacetylase and interacts with mitochondrial energy metabolism. *Plant Physiol* **164**: 1401–14
- König J, Baier M, Horling F, Kahmann U, Harris G, Schürmann P, Dietz K-J** (2002) The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5738–43
- König K** (2000) Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc* **200**: 83–104
- Koornneef A, Pieterse CMJ** (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol* **146**: 839–44
- Kornberg A** (1948) The participation of inorganic pyrophosphate in the reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* **176**: 1475
- Koster S, Upmeier B, Komossa D, Barz W** (1989) Nicotinic-acid conjugation in plants and plant-cell cultures of potato (*Solanum tuberosum*). *Zeitschrift für Naturforsch C-A J Biosci* **44**: 623–628
- Kozaki A, Takeba G** (1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* **384**: 557–560
- Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince A-S, Chaillou S, Ferrario-Méry S, Meyer C, Daniel-Vedele F** (2014) Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **65**: 789–98

- Kraszewska E** (2008) The plant Nudix hydrolase family. *Acta Biochim Pol* **55**: 663–71
- Krebs HA** (1937) The role of fumarate in the respiration of *Bacterium coli commune*. *Biochem J* **31**: 2095–124
- Krömer S, Heldt HW** (1991) On the Role of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Photosynthesis Metabolism as Studied by the Effect of Oligomycin on Photosynthesis in Protoplasts and Leaves of Barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol* **95**: 1270–6
- Kupke T, Caparrós-Martín JA, Malquichagua Salazar KJ, Culiáñez-Macià FA** (2009) Biochemical and physiological characterization of *Arabidopsis thaliana* AtCoAse: a Nudix CoA hydrolyzing protein that improves plant development. *Physiol Plant* **135**: 365–78
- Kuraishi S, Arai N, Ushijima T, Tazaki T** (1968) Oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate levels of plants hardened and unhardened against chilling injury. *Plant Physiol* **43**: 238–42
- Kurnasov O, Goral V, Colabroy K, Gerdes S, Anantha S, Osterman A, Begley TP, Campbell W, Drive P** (2003a) NAD Biosynthesis: Identification of the Tryptophan to Quinolinate Pathway in Bacteria. *Chem Biol* **10**: 1195–1204
- Kurnasov O V., Polanuyer BM, Ananta S, Sloutsky R, Tam a., Gerdes SY, Osterman AL** (2003b) Ribosylnicotinamide Kinase Domain of NadR Protein: Identification and Implications in NAD Biosynthesis. *J Bacteriol* **185**: 698–698
- Kwak JM, Mori IC, Pei Z-M, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JDG, Schroeder JI** (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* **22**: 2623–33
- Lacaze X** (2006) Développer des plantes résistantes à la sécheresse. Ed Sci Tech 16 p.
- Lacuesta M, Dever L V., Munoz-Rueda A, Lea PJ** (1997) A study of photorespiratory ammonia production in the C4 plant *Amaranthus edulis*, using mutants with altered photosynthetic capacities. *Physiol Plant* **99**: 447–455
- Lamb RS, Citarelli M, Teotia S** (2012) Functions of the poly(ADP-ribose) polymerase superfamily in plants. *Cell Mol Life Sci* **69**: 175–89
- 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**: 578–90
- Lassig R, Gutermuth T, Bey TD, Konrad KR, Romeis T** (2014) Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *Plant J* **78**: 94–106

- Lau C, Dölle C, Gossmann TI, Agledal L, Niere M, Ziegler M** (2010) Isoform-specific targeting and interaction domains in human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferases. *J Biol Chem* **285**: 18868–76
- Laval-Martin DL, Carré IA, Barbera SJ, Edmunds LN** (1990) Rhythmic changes in the activities of NAD kinase and NADP phosphatase in the achlorophyllous ZC mutant of *Euglena gracilis* Klebs (strain Z). *Arch Biochem Biophys* **276**: 433–41
- Lawson T, Blatt MR** (2014) Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol* **164**: 1556–70
- Leckie CP, McAinsh MR, Allen GJ, Sanders D, Hetherington A M** (1998) Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15837–42
- Lee HC** (2012) Cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) as messengers for calcium mobilization. *J Biol Chem* **287**: 31633–40
- Lee HC, Aarhus R** (1991) ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD⁺ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul* **2**: 203–9
- Lefebvre S, Lawson T, Zakhleniuk O V, Lloyd JC, Raines CA, Fryer M** (2005) Increased sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. *Plant Physiol* **138**: 451–60
- Lei, J., Finlayson, S., Salzman, R. A., Shan, L., & Zhu-Salzman, K.** (2014). BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 Modulates Arabidopsis Resistance to Green Peach Aphids via PHYTOALEXIN DEFICIENT4. *Plant Physiology*, **165**: 1657–1670.
- Leist M, Single B, Künstle G, Volbracht C, Hentze H, Nicotera P** (1997) Apoptosis in the absence of poly-(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* **233**: 518–22
- Lemaire G, Millard P** (1999) An ecophysiological approach to modelling resource fluxes in competing plants. *J Exp Bot* **50**: 15–28
- Lherminier J, Elmayan T, Fromentin J, Elaraqui KT, Vesa S, Morel J, Verrier J-L, Cailleteau B, Blein J-P, Simon-Plas F** (2009) NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 868–81
- Li C, Teng W, Shi Q, Zhang F** (2007) Multiple signals regulate nicotine synthesis in tobacco plant. *Plant Signal Behav* **2**: 280–1
- Li W-Y, Wang X, Li R, Li W-Q, Chen K-M** (2014) Genome-Wide Analysis of the NADK Gene Family in Plants. *PLoS One* **9**: 1–15

- Lindroth P, Mopper K** (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**:1667-74
- Linster CL, Van Schaffingen E, Hanson AD** (2013) Metabolite damage and its repair or pre-emption. *Nat Chem Biol* **9**: 72–80
- Liszakay A, van der Zalm E, Schopfer P** (2004) Production of reactive oxygen intermediates (O₂(.-), H₂O₂), and (.OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* **136**: 3114–23; discussion 3001
- Liu D, Zhou X, Li M, Zhu S, Qiu X** (2014a) Characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase gene from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Gene* **545**: 262–70
- Liu L, Li Y, Shi Z, Du G, Chen J** (2006) Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: Increase of NAD⁺ availability. *J Biotechnol* **126**: 173–85
- Liu M, Li Z, Chen G-W, Li Z-M, Wang L-P, Ye J-T, Luo H-B, Liu P-Q** (2014a) AG-690/11026014, a novel PARP-1 inhibitor, protects cardiomyocytes from AngII-induced hypertrophy. *Mol Cell Endocrinol* **392**: 14–22
- Liu Q, Graeff R, Kriksunov I a, Jiang H, Zhang B, Oppenheimer N, Lin H, Potter BVL, Lee HC, Hao Q** (2009a) Structural basis for enzymatic evolution from a dedicated ADP-ribosyl cyclase to a multifunctional NAD hydrolase. *J Biol Chem* **284**: 27637–45
- Liu S, Liang Q-M, Zhou W-W, Jiang Y-D, Zhu Q-Z, Yu H, Zhang C-X, Gurr GM, Zhu Z-R** (2014b) RNA interference of NADPH-cytochrome P450 reductase of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, increases susceptibility to insecticides. *Pest Manag Sci*. doi: 10.1002/ps.3760
- Liu T, Song T, Zhang X, Yuan H, Su L, Li W, Xu J, Liu S, Chen L, Chen T, et al.** (2014b) Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nat Commun* **5**: 4686
- Liu Y-J, Nunes-Nesi A, Wallström S V, Lager I, Michalecka AM, Norberg FEB, Widell S, Fredlund KM, Fernie AR, Rasmusson AG** (2009b) A redox-mediated modulation of stem bolting in transgenic *Nicotiana glauca* differentially expressing the external mitochondrial NADPH dehydrogenase. *Plant Physiol* **150**: 1248–59
- Louis J, Shah J** (2013) *Arabidopsis thaliana*-*Myzus persicae* interaction: shaping the understanding of plant defense against phloem-feeding aphids. *Front Plant Sci* **4**: 213
- Louis J, Singh V, Shah J** (2012) *Arabidopsis thaliana* - Aphid interaction. *The Arabidopsis Book* 1–19
- Lunn JE** (2007) Compartmentation in plant metabolism. *J Exp Bot* **58**: 35–47

- Ma X, Lv S, Zhang C, Yang C** (2013) Histone deacetylases and their functions in plants. *Plant Cell Rep* **32**: 465–78
- Macdonald SJ, Lin GG, Russell CW, Thomas GH, Douglas AE** (2012) The central role of the host cell in symbiotic nitrogen metabolism. *Proc Biol Sci* **279**: 2965–73
- Macho AP, Boutrot F, Rathjen JP, Zipfel C** (2012) ASPARTATE OXIDASE Plays an Important Role in Arabidopsis Stomatal Immunity. *Plant Physiol* **159**: 1845–56
- Maciejewska U, Kacperska A** (1987) Changes in the level of oxidized and reduced pyridine nucleotides during cold acclimation of winter rape plants. *Physiol Plant* **69**: 687–691
- Magni G, Amici A, Emanuelli M, Orsomando G, Raffaelli N, Ruggieri S** (2004) Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Curr Med Chem* **11**: 873–85
- Maier A, Fahnenstich H, von Caemmerer S, Engqvist MKM, Weber APM, Flügge U-I, Maurino VG** (2012) Transgenic Introduction of a Glycolate Oxidative Cycle into *A. thaliana* Chloroplasts Leads to Growth Improvement. *Front Plant Sci* **3**: 38
- Malonek S, Rojas MC, Hedden P, Gaskin P, Hopkins P, Tudzynski B** (2004) The NADPH-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. *J Biol Chem* **279**: 25075–84
- Mann DF, Byerrum RU** (1974) Activation of the de novo pathway for pyridine nucleotide biosynthesis prior to ricinine biosynthesis in castor beans. *Plant Physiol* **53**: 603–9
- Mano J, Belles-Boix E, Babiychuk E, Inzé D, Torii Y, Hiraoka E, Takimoto K, Slooten L, Asada K, Kushnir S** (2005) Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant Physiol* **139**: 1773–83
- Marbaix AY, Noël G, Detroux AM, Vertommen D, Van Schaftingen E, Linster CL** (2011) Extremely conserved ATP- or ADP-dependent enzymatic system for nicotinamide nucleotide repair. *J Biol Chem* **286**: 41246–52
- Marino D, Dunand C, Puppo A, Pauly N** (2012) A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci* **17**: 9–15
- Marinoni I, Nonnis S, Monteferrante C, Heathcote P, Härtig E, Böttger LH, Trautwein AX, Negri A, Albertini AM, Tedeschi G** (2008) Characterization of L-aspartate oxidase and quinolinate synthase from *Bacillus subtilis*. *FEBS J* **275**: 5090–107
- Maroco JP, Ku MSB, Edwards GE** (1997) Oxygen sensitivity of C4 photosynthesis: evidence from gas exchange and chlorophyll fluorescence analyses with different C4 subtypes. *Plant, Cell Environ* **20**: 1525–1533

- Di Martino C, Pallotta ML** (2011) Mitochondria-localized NAD biosynthesis by nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) heterotrophic tissues. *Planta* **234**: 657–70
- Di Martino ML, Fioravanti R, Barbabella G, Prosseda G, Colonna B, Casalino M** (2013) Molecular evolution of the nicotinic acid requirement within the *Shigella*/EIEC pathotype. *Int J Med Microbiol* **303**: 651–61
- Mashimo M, Kato J, Moss J** (2013) ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 regulates poly (ADP-ribose) degradation and cell death during oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 18964–9
- Masle J, Gilmore SR, Farquhar GD** (2005) The *ERECTA* gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. *Nature* **436**: 866–70
- Matsui A, Ashihara H** (2008) Nicotinate riboside salvage in plants: presence of nicotinate riboside kinase in mungbean seedlings. *Plant Physiol Biochem* **46**: 104–8
- Matsui A, Yin Y, Yamanaka K, Iwasaki M, Ashihara H** (2007) Metabolic fate of nicotinamide in higher plants. *Physiol Plant* **131**: 191–200
- Mattevi A, Tedeschi G, Bacchella L, Coda A, Negri A, Ronchi S** (1999) Structure of L-aspartate oxidase: implications for the succinate dehydrogenase/fumarate reductase oxidoreductase family. *Structure* **7**: 745–56
- Maulucci G, Troiani D, Eramo SLM, Paciello F, Podda MV, Paludetti G, Papi M, Maiorana A, Palmieri V, De Spirito M, et al** (2014) Time evolution of noise induced oxidation in outer hair cells: role of NAD(P)H and plasma membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta* **1840**: 2192–202
- McAusland L, Davey PA, Kanwal N, Baker NR, Lawson T** (2013) A novel system for spatial and temporal imaging of intrinsic plant water use efficiency. *J Exp Bot* **64**: 4993–5007
- McLennan AG** (2006) The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci* **63**: 123–43
- Medda R, Padiglia A, Lorrain A, Murgia B, Agrò AF, Castagnola M, Floris G** (2000) Purification and properties of a nucleotide pyrophosphatase from lentil seedlings. *J Protein Chem* **19**: 209–14
- Medrano H, Escalona JM, Bota J, Gulias J, Flexas J** (2002) Regulation of Photosynthesis of C3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Ann Bot* **89**: 895–905
- Meidner H, Mansfield T** (1968) Physiology of stomata. *Book of Physiol. stomata*. 179 pp.

- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969–80
- Mersmann S, Bourdais G, Rietz S, Robatzek S** (2010) Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiol* **154**: 391–400
- Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot J-P, Hell R** (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J* **52**: 973–86
- Meyer S, Scholz-Starke J, De Angeli A, Kovermann P, Burla B, Gambale F, Martinoia E** (2011) Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *Plant J* **67**: 247–57
- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P** (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 9908–13
- Miflin BJ** (1970) Studies on the sub-cellular location of particulate nitrate and nitrite reductase, glutamic dehydrogenase and other enzymes in barley roots. *Planta* **93**: 160–70
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R** (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal* **2**: ra45
- Miyake C** (2010) Alternative electron flows (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological functions. *Plant Cell Physiol* **51**: 1951–63
- Mittler R** (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* **11**: 15–9
- Moloi MJ, van der Westhuizen AJ** (2006) The reactive oxygen species are involved in resistance responses of wheat to the Russian wheat aphid. *J Plant Physiol* **163**: 1118–25
- Monaghan J, Zipfel C** (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 349–57
- Monshausen GB, Bibikova TN, Messerli MA, Shi C, Gilroy S** (2007) Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20996–1001
- Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S** (2009) Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **21**: 2341–56

- Moore CS, Cook-Johnson RJ, Rudhe C, Whelan J, Day DA, Wiskich JT, Soole KL** (2003) Identification of AtNDI1, an internal non-phosphorylating NAD(P)H dehydrogenase in Arabidopsis mitochondria. *Plant Physiol* **133**: 1968–78
- Moorhead GBG, Meek SEM, Douglas P, Bridges D, Smith CS, Morrice N, MacKintosh C** (2003) Purification of a plant nucleotide pyrophosphatase as a protein that interferes with nitrate reductase and glutamine synthetase assays. *Eur J Biochem* **270**: 1356–62
- Morgan J** (1992) Osmotic Components and Properties Associated With Genotypic Differences in Osmoregulation in Wheat. *Aust J Plant Physiol* **19**: 67
- Morison JIL, Baker NR, Mullineaux PM, Davies WJ** (2008) Improving water use in crop production. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* **363** (1491): 639-658
- Morré DJ, Morré DM, Ternes P** (2003) Auxin-activated nadh oxidase activity of soybean plasma membranes is distinct from the constitutive plasma membrane NADH oxidase and exhibits prion-like properties. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* **39**: 368–376
- Morris-Blanco KC, Cohan CH, Neumann JT, Sick TJ, Perez-Pinzon MA** (2014) Protein kinase C epsilon regulates mitochondrial pools of Nampt and NAD following resveratrol and ischemic preconditioning in the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* **34**: 1024–32
- Mortarino M, Negri A, Tedeschi G, Simonic T, Duga S, Gassen HG, Ronchi S** (1996) L-Aspartate oxidase from *E. coli* I. Characterization of coenzyme binding and product inhibition. *Eur J Biochem* **239**: 418–426
- Moser B, Winterhalter KH, Richter C** (1983) Purification and properties of a mitochondrial NAD⁺ glycohydrolase. *Arch Biochem Biophys* **224**: 358–64
- Mueller N, Gerber J, Johnston M** (2012) Closing yield gaps through nutrient and water management. *Nature Letter* **490**: 254-257
- Müller K, Carstens AC, Linkies A, Torres MA, Leubner-Metzger G** (2009) The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening. *New Phytol* **184**: 885–97
- Müller K, Linkies A, Leubner-Metzger G, Kermode AR** (2012) Role of a respiratory burst oxidase of *Lepidium sativum* (cress) seedlings in root development and auxin signalling. *J Exp Bot* **63**: 6325–34
- Mullineaux PM, Rausch T** (2005) Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynth Res* **86**: 459–74
- Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K, Endo T, Tasaka M, Shikanai T** (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* **429**: 579–82

- Muñoz FJ, Baroja-Fernández E, Morán-Zorzano MT, Alonso-Casajús N, Pozueta-Romero J** (2006) Cloning, expression and characterization of a Nudix hydrolase that catalyzes the hydrolytic breakdown of ADP-glucose linked to starch biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**: 926–34
- Mur L a J, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E** (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* **59**: 501–20
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- De Murcia G, Ménissier de Murcia J** (1994) Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* **19**: 172–6
- Nasu S, Wicks F, Gholson R** (1982) L-Aspartate oxidase, a newly discovered enzyme of *Escherichia coli* is the B protein of Quinolinate Synthetase. *Biol Chem* **257**: 626–632
- Navazio L, Bewell MA, Siddiqua A, Dickinson GD, Galione A, Sanders D** (2000) Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8693–8
- Navazio L, Mariani P, Sanders D** (2001) Mobilization of Ca²⁺ by cyclic ADP-ribose from the endoplasmic reticulum of cauliflower florets. *Plant Physiol* **125**: 2129–38
- Nestler J, Liu S, Wen T-J, Paschold A, Marcon C, Tang HM, Li D, Li L, Meeley RB, Sakai H, et al.** (2014) Roothairless5, which functions in maize (*Zea mays* L.) root hair initiation and elongation encodes a monocot-specific NADPH oxidase. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.12578
- Neuburger M, Day DA, Douce R** (1985) Transport of NAD in Percoll-Purified Potato Tuber Mitochondria: Inhibition of NAD Influx and Efflux by N-4-Azido-2-nitrophenyl-4-aminobutyryl-3'-NAD. *Plant Physiol* **78**: 405–10
- Neuburger M, Douce R** (1983) Slow passive diffusion of NAD⁺ between intact isolated plant mitochondria and suspending medium. *Biochem J* **216**: 443–50
- Newton RJ, Bhaskaran S, Puryear JD, Smith RH** (1986) Physiological Changes in Cultured Sorghum Cells in Response to Induced Water Stress: II. Soluble Carbohydrates and Organic Acids. *Plant Physiol* **81**: 626–9
- Ng DW-K, Miller M, Yu HH, Huang T-Y, Kim E-D, Lu J, Xie Q, McClung CR, Chen ZJ** (2014) A Role for CHH Methylation in the Parent-of-Origin Effect on Altered Circadian Rhythms and Biomass Heterosis in *Arabidopsis* Intraspecific Hybrids. *Plant Cell* **26**: 2430–2440

- Niehaus TD, Richardson LGL, Gidda SK, EIBadawi-Sidhu M, Meissen JK, Mullen RT, Fiehn O, Hanson AD** (2014) Plants utilize a highly conserved system for repair of NADH and NADPH hydrates. *Plant Physiol* **165**: 52–61
- Nikiforov A, Dölle C, Niere M, Ziegler M** (2011) Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J Biol Chem* **286**: 21767–78
- Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, et al.** (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell* **23**: 2169–83
- Noctor G** (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ* **29**: 409–25
- Noctor G, Foyer CH** (1998) A re-evaluation of the ATP :NADPH budget during C3 photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *J Exp Bot* **49**: 1895–1908
- Noctor G, Queval G, Gakière B** (2006) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J Exp Bot* **57**: 1603–20
- Noctor G, Queval G, Hager J, Gakière B** (2008) Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. **59**: 135–146
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Fernie AR** (2005) Enhancing crop yield in Solanaceous species through the genetic manipulation of energy metabolism. *Biochem Soc Trans* **33**: 1430–4
- Oei SL, Griesenbeck J, Ziegler M, Schweiger M** (1998) A novel function of poly(ADP-ribosyl)ation: silencing of RNA polymerase II-dependent transcription. *Biochemistry* **37**: 1465–9
- Oei SL, Ziegler M** (2000) ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). *J Biol Chem* **275**: 23234–9
- Ogawa T, Ishikawa K, Harada K, Fukusaki E, Yoshimura K, Shigeoka S** (2009) Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, AtNUDX2, confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis plants. *Plant J* **57**: 289–301
- Ogawa T, Ueda Y, Yoshimura K, Shigeoka S** (2005) Comprehensive analysis of cytosolic Nudix hydrolases in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **280**: 25277–83

- Ogawa T, Yoshimura K, Miyake H, Ishikawa K, Ito D, Tanabe N, Shigeoka S** (2008) Molecular characterization of organelle-type Nudix hydrolases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **148**: 1412–24
- Ohashi K, Kawai S, Murata K** (2013) Secretion of quinolinic acid, an intermediate in the kynurenine pathway, for utilization in NAD⁺ biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **12**: 648–53
- Ohlrogge J, Browse J** (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 957–70
- Olejnik K, Kraszewska E** (2005) Cloning and characterization of an *Arabidopsis thaliana* Nudix hydrolase homologous to the mammalian GFG protein. *Biochim Biophys Acta* **1752**: 133–41
- Ollagnier-de Choudens S, Loiseau L, Sanakis Y, Barras F, Fontecave M** (2005) Quinolinate synthetase, an iron-sulfur enzyme in NAD biosynthesis. *FEBS Lett* **579**: 3737–43
- Oppenheimer NJ, Kaplan NO** (1974) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase catalyzed hydration of the 5-6 double bond of reduced beta-nicotinamide adenine dinucleotide (betaNADH). Formation of beta-6-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydronicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry* **13**: 4685–94
- Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C** (2009) The Mechanisms Involved in Seed Dormancy Alleviation by Hydrogen Cyanide Unravel the Role of Reactive Oxygen Species as Key Factors of Cellular Signaling during Germination. *Plant Physiol* **150**: 494–505
- Orechoff A, Menshikoff G** (1931) The alkaloids of *Anabasis aphylla* L. *Ber* **64**: 266
- Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP** (2014a) Response of plants to water stress. *Front Plant Sci* **5**: 1–8
- Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP** (2014b) ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytol* **202**: 35–49
- Osmond C, Grace S** (1996) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: Quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis (vol 46, pg 1351, 1995). *J Exp Bot* **47**: 604–604
- Outten CE, Culotta VC** (2003) A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **22**: 2015–24
- Ozment C, Barchue J, DeLucas LJ, Chattopadhyay D** (1999) Structural study of *Escherichia coli* NAD synthetase: overexpression, purification, crystallization, and preliminary crystallographic analysis. *J Struct Biol* **127**: 279–82
- Palmieri F, Rieder B, Ventrella A, Blanco E, Do PT, Nunes-Nesi A, Trauth AU, Fiermonte G, Tjaden J, Agrimi G, et al** (2009) Molecular identification and

- functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. *J Biol Chem* **284**: 31249–59
- Pan L-Z, Ahn D-G, Sharif T, Clements D, Gujar SA, Lee PWK** (2014) The NAD⁺ synthesizing enzyme nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 2 (NMNAT-2) is a p53 downstream target. *Cell Cycle* **13**: 1041–8
- Panda S, Poirier GG, Kay SA** (2002) *tej* defines a role for poly(ADP-ribosylation) in establishing period length of the *Arabidopsis* circadian oscillator. *Dev Cell* **3**: 51–61
- Passioura J** (2004) Water-use efficiency in farmers' fields. *Water Use Effic. Plant Biol.*
- Pastor V, Gamir J, Camañes G, Cerezo M, Sánchez-Bel P, Flors V** (2014) Disruption of the ammonium transporter AMT1.1 alters basal defenses generating resistance against *Pseudomonas syringae* and *Plectosphaerella cucumerina*. *Front Plant Sci* **5**: 231
- Pellny TK, Van Aken O, Dutilleul C, Wolff T, Groten K, Bor M, De Paepe R, Reyss A, Van Breusegem F, Noctor G, et al** (2008) Mitochondrial respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogen-dependent regulation of plant architecture in *Nicotiana sylvestris*. *Plant J* **54**: 976–92
- Pellny TK, Locato V, Vivancos PD, Markovic J, De Gara L, Pallardó F V, Foyer CH** (2009) Pyridine nucleotide cycling and control of intracellular redox state in relation to poly (ADP-ribose) polymerase activity and nuclear localization of glutathione during exponential growth of *Arabidopsis* cells in culture. *Mol Plant* **2**: 442–56
- Penfound T, Foster JW** (1999) NAD-dependent DNA-binding activity of the bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**: 648–55
- Perchepied L, Balagué C, Riou C, Claudel-Renard C, Rivière N, Grezes-Besset B, Roby D** (2010) Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 846–60
- Pérez-Ruiz JM, Spínola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ** (2006) Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* **18**: 2356–68
- Petrack B, Greengard P, Craston A, Kalinsky HJ** (1963) Nicotinamide deamidase in rat liver and the biosynthesis of NAD. *Biochem Biophys Res Commun* **13**: 472–477
- Pétriaccq P** (2011) Étude de la biosynthèse du NAD chez les plantes : Conséquences physiologiques de sa manipulation chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse, Orsay, Fr.

- Pétriacq P, de Bont L, Hager J, Didierlaurent L, Mauve C, Guérard F, Noctor G, Pelletier S, Renou J-P, Tcherkez G, et al.** (2012) Inducible NAD overproduction in *Arabidopsis* alters metabolic pools and gene expression correlated with increased salicylate content and resistance to Pst-AvrRpm1. *Plant J* **70**: 650–65
- Pétriacq P, de Bont L, Tcherkez G, Gakière B** (2013) NAD Not just a pawn on the board of plant-pathogen interactions. *Plant Signal Behav* **8**: 1–11
- Pfalz M, Vogel H, Mitchell-Olds T, Kroymann J** (2007) Mapping of QTL for resistance against the crucifer specialist herbivore *Pieris brassicae* in a new *Arabidopsis* inbred line population, Da(1)-12 x Ei-2. *PLoS One* **2**: e578
- Pfister M, Ogilvie A, da Silva CP, Grahnert A, Guse AH, Hauschildt S** (2001) NAD degradation and regulation of CD38 expression by human monocytes/macrophages. *Eur J Biochem* **268**: 5601–8
- Phillips DA, Joseph CM, Maxwell CA** (1992) Trigonelline and Stachydrine Released from Alfalfa Seeds Activate NodD2 Protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* **99**: 1526–31
- Piattoni C V, Guerrero SA, Iglesias AA** (2013) A differential redox regulation of the pathways metabolizing glyceraldehyde-3-phosphate tunes the production of reducing power in the cytosol of plant cells. *Int J Mol Sci* **14**: 8073–92
- Picault N, Hodges M, Palmieri L, Palmieri F** (2004) The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **9**: 138–46
- Podgórska A, Ostaszewska M, Gardeström P, Rasmusson AG, Szal B** (2014) In comparison with nitrate nutrition, ammonium nutrition increases growth of the frostbite1 *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.12404
- Pogány M, von Rad U, Grün S, Dongó A, Pintye A, Simoneau P, Bahnweg G, Kiss L, Barna B, Durner J** (2009) Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis*-*Alternaria* pathosystem. *Plant Physiol* **151**: 1459–75
- Pollak N, Dölle C, Ziegler M** (2007) The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *Biochem J* **402**: 205–18
- Pollak N, Niere M, Ziegler M** (2007c) NAD kinase levels control the NADPH concentration in human cells. *J Biol Chem* **282**: 33562–71
- Pospíšilová L, Formanek P, Kucerik J, Liptaj T, Losak T, Martensson A** (2011) Land use effects on carbon quality and soil biological properties in Eutric Cambisol. *Acta Agric Scand Sect B - Soil Plant Sci* **61**: 661–669
- Potocký M, Jones MA, Bezdova R, Smirnov N, Zárský V** (2007) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol* **174**: 742–51

- Pottier M-A, Bozzolan F, Chertemps T, Jacquin-Joly E, Lalouette L, Siaussat D, Maibèche-Coisne M** (2012) Cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in the olfactory organ of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Insect Mol Biol* **21**: 568–80
- Poulson ME, Boeger MRT, Donahue RA** (2006) Response of photosynthesis to high light and drought for *Arabidopsis thaliana* grown under a UV-B enhanced light regime. *Photosynth Res* **90**: 79–90
- Preiss J, Handler P** (1958a) Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates. *J Biol Chem* **233**: 488–92
- Preiss J, Handler P** (1958b) Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. *J Biol Chem* **233**: 493–500
- Proels RK, Oberhollenzer K, Pathuri IP, Hensel G, Kumlehn J, Hückelhoven R** (2010) RBOHF2 of barley is required for normal development of penetration resistance to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f. sp. hordei. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 1143–50
- Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, Guern J** (1997) Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell* **9**: 2077–2091
- Queval G, Noctor G** (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal Biochem* **363**: 58–69
- Rachmilevitch S, Cousins AB, Bloom AJ** (2004) Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11506–10
- Rafter GW, Chaykin S, Krebs EG** (1954) The action of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on reduced diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* **208**: 799–811
- Raghavendra AS, Padmasree K** (2003) Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci* **8**: 546–53
- Raines C A** (2011) Increasing photosynthetic carbon assimilation in C3 plants to improve crop yield: current and future strategies. *Plant Physiol* **155**: 36–42
- Ramsey JS, MacDonald SJ, Jander G, Nakabachi A, Thomas GH, Douglas AE** (2010) Genomic evidence for complementary purine metabolism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect Mol Biol* **19 Suppl 2**: 241–8
- Rasmusson AG, Møller IM** (1990) NADP-Utilizing Enzymes in the Matrix of Plant Mitochondria. *Plant Physiol* **94**: 1012–8

- Rasmusson AG, Soole KL, Elthon TE** (2004) Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 23–39
- Rasmusson AG, Wallström SV** (2010) Involvement of mitochondria in the control of plant cell NAD(P)H reduction levels. *Biochem Soc Trans* **38**: 661–6
- Rawat N, Himabindu K, Neeraja CN, Nair S, Bentur JS** (2013) Suppressive subtraction hybridization reveals that rice gall midge attack elicits plant-pathogen-like responses in rice. *Plant Physiol Biochem* **63**: 122–30
- Raybould AF, Moyes CL** (2001) The ecological genetics of aliphatic glucosinolates. *Heredity (Edinb)* **87**: 383–91
- Rehan L, Laszki-Szczańchor K, Sobieszczkańska M, Polak-Jonkisz D** (2014) SIRT1 and NAD as regulators of ageing. *Life Sci* **105**: 1–6
- Reidl J, Schlör S, Kraiss A, Schmidt-Brauns J, Kemmer G, Soleva E** (2000) NADP and NAD utilization in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **35**: 1573–81
- Reumann S, Heupel R, Heldt H** (1994) Compartmentation studies on spinach leaf peroxisomes .2. Evidence for the transfer of reductant from the cytosol to the peroxisomal compartment via a malate shuttle. *Planta* **193**: 167–173
- Rhodes D, Rich PJ, Brunk DG, Ju GC, Rhodes JC, Pauly MH, Hansen LA** (1989) Development of two isogenic sweet corn hybrids differing for glycinebetaine content. *Plant Physiol* **91**: 1112–21
- Riazunnisa K, Padmavathi L, Bauwe H, Raghavendra AS** (2006) Markedly low requirement of added CO₂ for photosynthesis by mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum*): possible roles of photorespiratory CO₂ and carbonic anhydrase. *Physiol Plant* **128**: 763–772
- Richter C** (1987) NADP⁺ phosphatase: a novel mitochondrial enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **146**: 253–7
- Richter AS, Peter E, Rothbart M, Schlicke H, Toivola J, Rintamäki E, Grimm B** (2013) Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. *Plant Physiol* **162**: 63–73
- Rius SP, Casati P, Iglesias AA, Gomez-Casati DF** (2008) Characterization of *Arabidopsis* lines deficient in GAPC-1, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiol* **148**: 1655–67
- Rizzi M, Schindelin H** (2002) Structural biology of enzymes involved in NAD and molybdenum cofactor biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 709–20
- Roden LC, Ingle RA** (2009) Lights, rhythms, infection: the role of light and the circadian clock in determining the outcome of plant-pathogen interactions. *Plant Cell* **21**: 2546–52

- Rodionova IA, Schuster BM, Guinn KM, Sorci L, Scott DA, Li X, Kheterpal I, Shoen C, Cynamon M, Locher C, et al.** (2014) Metabolic and bactericidal effects of targeted suppression of NadD and NadE enzymes in mycobacteria. *MBio*. doi: 10.1128/mBio.00747-13
- Rousset C** (2009) Etude structurale et fonctionnelle de la Quinolinate Synthase: une protéine fer-soufre cible d'agents antibactériens. Thèse, Grenoble, Fr.
- Rousset C, Fontecave M, Ollagnier de Choudens S** (2008) The [4Fe-4S] cluster of quinolinate synthase from *Escherichia coli*: investigation of cluster ligands. *FEBS Lett* **582**: 2937–44
- Roycewicz P, Malamy JE** (2012) Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on *Arabidopsis* root and shoot system growth in laboratory assays. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**: 1489–500
- Ruiz JM, Sánchez E, García PC, López-Lefebvre LR, Rivero RM, Romero L** (2002) Proline metabolism and NAD kinase activity in greenbean plants subjected to cold-shock. *Phytochemistry* **59**: 473–478
- Ryan SM, Cane KA, DeBoer KD, Sinclair SJ, Brimblecombe R, Hamill JD** (2012) Structure and expression of the quinolinate phosphoribosyltransferase (QPT) gene family in *Nicotiana*. *Plant Sci* **188-189**: 102–10
- Ryrie IJ, Scott KJ** (1969) Nicotinate, quinolinate and nicotinamide as precursors in the biosynthesis of nicotinamide-adenine dinucleotide in barley. *Biochem J* **115**: 679–85
- Ryrie IJ, Scott KJ** (1968) Metabolic Regulation in Diseased Leaves II . Changes in Nicotinamide Nucleotide Coenzymes in Barley Leaves Infected with Powdery Mildew **43**: 687–692
- Sabar M, De Paepe R, de Kouchkovsky Y** (2000) Complex I impairment, respiratory compensations, and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol* **124**: 1239–50
- Sadoul K, Wang J, Diagouraga B, Khochbin S** (2011) The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 1–15
- Sagi M, Fluhr R** (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol* **141**: 336–40
- Saitoh F, Noma M, Kawashima N** (1985) The alkaloid contents of sixty *Nicotiana* species. *Phytochemistry* **24**: 477–480
- Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, Sunohara H, Fujioka S, Ueguchi-Tanaka M, Mizutani M, Sakata K, Takatsuto S, Yoshida S, et al.** (2006) Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. *Nat Biotechnol* **24**: 105–9

- Sakuraba H, Tsuge H, Yoneda K, Katunuma N, Ohshima T** (2005) Crystal structure of the NAD biosynthetic enzyme quinolinate synthase. *J Biol Chem* **280**: 26645–8
- Sánchez J-P, Duque P, Chua N-H** (2004) ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis. *Plant J* **38**: 381–95
- Sanchez-Villarreal A, Shin J, Bujdoso N, Obata T, Neumann U, Du S-X, Ding Z, Davis AM, Shindo T, Schmelzer E, et al.** (2013) TIME FOR COFFEE is an essential component in the maintenance of metabolic homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **76**: 188–200
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**: S401–17
- Santarius KA** (1973) The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. *Planta* **113**: 105–14
- Saunders JW, Bush LP** (1979) Nicotine Biosynthetic Enzyme Activities in Nicotiana tabacum L. Genotypes with Different Alkaloid Levels. *Plant Physiol* **64**: 236–40
- Sauve AA, Youn DY** (2012) Sirtuins: NAD(+)-dependent deacetylase mechanism and regulation. *Curr Opin Chem Biol* **16**: 535–43
- Savidov NA, Alikulov ZA, Lips SH** (1998) Identification of an endogenous NADPH-regenerating system coupled to nitrate reduction in vitro in plant and fungal crude extracts. *Plant Sci* **133**: 33–45
- Schafer FQ, Buettner GR** (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**: 1191–1212
- Scheibe R** (1984) Quantitation of the thiol group involved in the reductive activation of NADP-malate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **788**: 241–247
- Scheibe R** (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol Plant* **120**: 21–26
- Scheibe R, Backhausen JE, Emmerlich V, Holtgreffe S** (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J Exp Bot* **56**: 1481–9
- Scheibe R, Jacquot JP** (1983) NADP regulates the light activation of NADP-dependent malate dehydrogenase. *Planta* **157**: 548–53
- Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M, Stitt M** (1997) Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. *Plant Cell* **9**: 783–798

- Schippers JHM, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP** (2008) The Arabidopsis onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *Plant Cell* **20**: 2909–25
- Schlüter U, Muschak M, Berger D, Altmann T** (2003) Photosynthetic performance of an Arabidopsis mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. *J Exp Bot* **54**: 867–74
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU** (2005) A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nat Genet* **37**: 501–6
- Schomburg I, Chang A, Schomburg D** (2014) Standardization in enzymology—Data integration in the world’s enzyme information system BRENDA. *Perspect Sci* **1**: 15–23
- Schwessinger B, Zipfel C** (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 389–95
- Sebastián C, Satterstrom FK, Haigis MC, Mostoslavsky R** (2012) From sirtuin biology to human diseases: an update. *J Biol Chem* **287**: 42444–52
- Selinski J, König N, Wellmeyer B, Hanke GT, Linke V, Neuhaus HE, Scheibe R** (2014) The plastid-localized NAD-dependent malate dehydrogenase is crucial for energy homeostasis in developing Arabidopsis thaliana seeds. *Mol Plant* **7**: 170–86
- Selinski J, Scheibe R** (2014) Lack of malate valve capacities lead to improved N-assimilation and growth in transgenic A. thaliana plants. *Plant Signal. Behav.* **9**:
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, et al.** (2002) A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* **14**: 2985–94
- Setterdahl AT, Chivers PT, Hirasawa M, Lemaire SD, Keryer E, Miginiac-Maslow M, Kim S-K, Mason J, Jacquot J-P, Longbine CC, et al** (2003) Effect of pH on the oxidation-reduction properties of thioredoxins. *Biochemistry* **42**: 14877–84
- Sharkey TD, Seemann JR, Percy RW** (1986) Contribution of Metabolites of Photosynthesis to Postillumination CO₂ Assimilation in Response to Lightfleets. *Plant Physiol* **82**: 1063–8
- Shen W, Wei Y, Dauk M, Tan Y, Taylor DC, Selvaraj G, Zou J** (2006) Involvement of a Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase in Modulating the NADH / NAD⁺ Ratio Provides Evidence of a Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Shuttle in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 422–441

- Shen W, Wei Y, Dauk M, Zheng Z, Zou J** (2003) Identification of a mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: evidence for a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in plants. *FEBS Lett* **536**: 92–6
- Shi Q, Li C, Zhang F** (2006) Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by mechanical wounding is regulated by auxin. *J Exp Bot* **57**: 2899–907
- Shibata K, Murata K** (1986) Blood NAD as an index of niacin nutrition. *Nutr Int* **2**: 177–181
- Shimizu MM, Mazzafera P** (2000) A Role for Trigonelline During Imbibition and Germination of Coffee Seeds. *Plant Biol* **2**: 605–611
- Shoji T, Hashimoto T** (2011a) Recruitment of a duplicated primary metabolism gene into the nicotine biosynthesis regulon in tobacco. *Plant J* **67**: 949–59
- Shoji T, Hashimoto T** (2011b) Tobacco MYC2 regulates jasmonate-inducible nicotine biosynthesis genes directly and by way of the NIC2-locus ERF genes. *Plant Cell Physiol* **52**: 1117–30
- Shoji T, Hashimoto T** (2012) DNA-binding and transcriptional activation properties of tobacco NIC2-locus ERF189 and related transcription factors. *Plant Biotechnol* **29**: 35–42
- Shoji T, Hashimoto T** (2014) Stress-induced expression of NICOTINE2-locus genes and their homologs encoding Ethylene Response Factor transcription factors in tobacco. *Phytochemistry*. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.05.017
- Shull NP, Spinelli SL, Phizicky EM** (2005) A highly specific phosphatase that acts on ADP-ribose 1"-phosphate, a metabolite of tRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **33**: 650–60
- Simon C, Langlois-Meurinne M, Bellvert F, Garmier M, Didierlaurent L, Massoud K, Chaouch S, Marie A, Bodo B, Kauffmann S, et al.** (2010) The differential spatial distribution of secondary metabolites in *Arabidopsis* leaves reacting hypersensitively to *Pseudomonas syringae* pv. tomato is dependent on the oxidative burst. *J Exp Bot* **61**: 3355–3370
- Sinclair SJ, Murphy KJ, Birch CD, Hamill JD** (2000) Molecular characterization of quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRtase) in *Nicotiana*. *Plant Mol Biol* **44**: 603–17
- Sinclair T, Ruffy T** (2012) Nitrogen and water resources commonly limit crop yield increases, not necessarily plant genetics. *Glob. Food Sec.*
- Sisson VA, Severson RF** (1990) Alkaloid composition of the *Nicotiana* species. *Beitr Tab* **14**: 327–339
- Smyth LM, Bobalova J, Mendoza MG, Lew C, Mutafova-Yambolieva VN** (2004) Release of beta-nicotinamide adenine dinucleotide upon stimulation of

- postganglionic nerve terminals in blood vessels and urinary bladder. *J Biol Chem* **279**: 48893–903
- Song M-G, Bail S, Kiledjian M** (2013) Multiple Nudix family proteins possess mRNA decapping activity. *RNA* **19**: 390–9
- Sorci L, Blaby I, De Ingeniis J, Gerdes S, Raffaelli N, de Crécy Lagard V, Osterman A** (2010) Genomics-driven reconstruction of acinetobacter NAD metabolism: insights for antibacterial target selection. *J Biol Chem* **285**: 39490–9
- Soriano E V, Zhang Y, Colabroy KL, Sanders JM, Settembre EC, Dorrestein PC, Begley TP, Ealick SE** (2013) Active-site models for complexes of quinolinate synthase with substrates and intermediates. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**: 1685–96
- Sparla F, Costa A, Lo Schiavo F, Pupillo P, Trost P** (2006) Redox regulation of a novel plastid-targeted beta-amylase of Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**: 840–50
- Spencer RL, Preiss J** (1967) Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. The purification and the properties of diphosphopyridine nucleotide synthetase from *Escherichia coli* b. *J Biol Chem* **242**: 385–92
- Spielbauer G, Li L, Römisch-Margl L, Do PT, Fouquet R, Fernie AR, Eisenreich W, Gierl A, Settles AM** (2013) Chloroplast-localized 6-phosphogluconate dehydrogenase is critical for maize endosperm starch accumulation. *J Exp Bot* **64**: 2231–42
- Sriram G, Fulton DB, Iyer V V, Peterson JM, Zhou R, Westgate ME, Spalding MH, Shanks J V** (2004) Quantification of compartmented metabolic fluxes in developing soybean embryos by employing biosynthetically directed fractional ¹³C labeling, two-dimensional [(¹³C), (¹H)] nuclear magnetic resonance, and comprehensive isotopomer balancing. *Plant Physiol* **136**: 3043–57
- Stanhill G** (1986) Water use efficiency. *Adv. Agron.*
- Steffen JD, Pascal JM** (2013) New players to the field of ADP-ribosylation make the final cut. *EMBO J* **32**: 1205–7
- Stein LR, Imai S-I** (2012) The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab* **23**:420-8
- Stitt M** (1986) Limitation of Photosynthesis by Carbon Metabolism : I. Evidence for Excess Electron Transport Capacity in Leaves Carrying Out Photosynthesis in Saturating Light and CO₂. *Plant Physiol* **81**: 1115–22
- Stitt M, Lilley RM, Heldt HW** (1982) Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts, and mitochondria of wheat leaf protoplasts. *Plant Physiol* **70**: 971–7

- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P** (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**: 835–41
- Stündl U, Schneider B** (2001) 3 β -Brassinosteroid dehydrogenase activity in *Arabidopsis* and tomato. *Phytochemistry* **58**: 989–994
- Sulpice R, Nikoloski Z, Tschoep H, Antonio C, Kleessen S, Larhlimi A, Selbig J, Ishihara H, Gibon Y, Fernie AR, et al.** (2013) Impact of the carbon and nitrogen supply on relationships and connectivity between metabolism and biomass in a broad panel of *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiol* **162**: 347–63
- Sunkar R, Bartels D, Kirch H-H** (2003) Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J* **35**: 452–64
- Swarthout D, Harper E, Judd S, Gonthier D, Shyne R, Stowe T, Bultman T** (2009) Measures of leaf-level water-use efficiency in drought stressed endophyte infected and non-infected tall fescue grasses. *Environ Exp Bot* **66**: 88–93
- Swindall AF, Stanley JA, Yang ES** (2013) PARP-1: Friend or Foe of DNA Damage and Repair in Tumorigenesis? *Cancers (Basel)* **5**: 943–58
- Szal B, Dabrowska Z, Malmberg G, Gardeström P, Rychter AM** (2008) Changes in energy status of leaf cells as a consequence of mitochondrial genome rearrangement. *Planta* **227**: 697–706
- Szurmak B, Wystouch-Cieszyńska A, Wszelaka-Rylik M, Bal W, Dobrzańska M** (2008) A diadenosine 5',5''-P1P4 tetraphosphate (Ap4A) hydrolase from *Arabidopsis thaliana* that is activated preferentially by Mn²⁺ ions. *Acta Biochim Pol* **55**: 151–60
- Tahir Abdul-Razzak N, Werck D** (2006) Method for producing plants with increased biomass. WO/2006/100573
- Taira M, Valtersson U, Burkhardt B, Ludwig RA** (2004) *Arabidopsis thaliana* GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell* **16**: 2048–58
- Taiz L, Zeiger E** (2008) *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc., 5th Ed 782 p.
- Takahama U, Shimizu-Takahama M, Heber U** (1981) The redox state of the NADP system in illuminated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **637**: 530–539
- Takahara K, Kasajima I, Takahashi H, Hashida S, Itami T, Onodera H, Toki S, Yanagisawa S, Kawai-Yamada M, Uchimiya H** (2010) Metabolome and photochemical analysis of rice plants overexpressing *Arabidopsis* NAD kinase gene. *Plant Physiol* **152**: 1863–73

- Takahashi H, Takahara K, Hashida S, Hirabayashi T, Fujimori T, Kawai-Yamada M, Yamaya T, Yanagisawa S, Uchimiya H** (2009) Pleiotropic modulation of carbon and nitrogen metabolism in Arabidopsis plants overexpressing the NAD kinase2 gene. *Plant Physiol* **151**: 100–113
- Takahashi H, Watanabe A, Tanaka A, Hashida S, Kawai-yamada M, Sonoike K, Uchimiya H** (2006) Chloroplast NAD Kinase is Essential for Energy Transduction Through the Xanthophyll Cycle in Photosynthesis. *Plant Cell Physiol* **47**: 1678–1682
- Takahashi S, Bauwe H, Badger M** (2007) Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **144**: 487–494
- Taniguchi M, Taniguchi Y, Kawasaki M, Takeda S, Kato T, Sato S, Tabata S, Miyake H, Sugiyama T** (2002) Identifying and characterizing plastidic 2-oxoglutarate/malate and dicarboxylate transporters in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **43**: 706–17
- Talts E, Oja V, Rämme H, Rasulov B, Anijalg A, Laisk A** (2007) Dark inactivation of ferredoxin-NADP reductase and cyclic electron flow under far-red light in sunflower leaves. *Photosynth Res* **94**: 109–20
- Tanaka Y, Sugano SS, Shimada T, Hara-Nishimura I** (2013) Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in Arabidopsis. *New Phytol* **198**: 757–64
- Taniguchi M, Taniguchi Y, Kawasaki M, Takeda S, Kato T, Sato S, Tabata S, Miyake H, Sugiyama T** (2002) Identifying and characterizing plastidic 2-oxoglutarate/malate and dicarboxylate transporters in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **43**: 706–17
- Tardieu F, Zhang J, Gowing DJG** (1993) Stomatal control by both [ABA] in the xylem sap and leaf water status: a test of a model for draughted or ABA-fed field-grown maize. *Plant, Cell Environ* **16**: 413–420
- Tarr JB, Arditti J** (1982) Niacin Biosynthesis in Seedlings of Zea mays. *Plant Physiol* **69**: 553–6
- Tawfik DS** (2010) Messy biology and the origins of evolutionary innovations. *Nat Chem Biol* **6**: 692–6
- Tcherkez G, Mahé A, Gauthier P, Mauve C, Gout E, Bligny R, Cornic G, Hodges M** (2009) In folio respiratory fluxomics revealed by ¹³C isotopic labeling and H/D isotope effects highlight the noncyclic nature of the tricarboxylic acid “cycle” in illuminated leaves. *Plant Physiol* **151**: 620–30

- Tcherkez G, Nogués S, Bleton J, Cornic G, Badeck F, Ghashghaie J** (2003) Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO₂ in French bean. *Plant Physiol* **131**: 237–44
- Tedeschi G, Ronchi S, Simonc T, Treu C, Mattevi A, Negri A** (2001) Probing the active site of L-aspartate oxidase by site-directed mutagenesis: role of basic residues in fumarate reduction. *Biochemistry* **40**: 4738–44
- Tezuka T, Yamamoto Y** (1975) Photoactivation of NAD Kinase through Phytochrome: Phosphate Donors and Cofactors. *Plant Physiol* **56**: 728–30
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ** (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* **23**: 4–15
- Titok V V., Rusinova O V., Khotyleva L V.** (1995) Changes of nicotinamide coenzymes and adenylate energy charge in leaves of hybrid and parental tomato forms in an in vitro culture. *Biol Plant* **37**: 507–513
- Todisco S, Agrimi G, Castegna A, Palmieri F** (2006) Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 1524–31
- Torres MA, Dangl JL** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 397–403
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG** (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**: 517–22
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL** (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **37**: 1130–4
- Turner N** (1997) Further progress in crop water relations. *Adv Agron* **58**: 293–338
- Turner WL, Waller JC, Vanderbeld B, Snedden WA** (2004) Cloning and characterization of two NAD kinases from Arabidopsis. identification of a calmodulin binding isoform. *Plant Physiol* **135**: 1243–55
- Upmeier B, Gross W, Köster S, Barz W** (1988) Purification and properties of S-adenosyl-L-methionine:nicotinic acid-N-methyltransferase from cell suspension cultures of *Glycine max* L. *Arch Biochem Biophys* **262**: 445–54
- Valerio C, Costa A, Marri L, Issakidis-Bourguet E, Pupillo P, Trost P, Sparla F** (2011) Thioredoxin-regulated beta-amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. *J Exp Bot* **62**: 545–55

- Vanderauwera S, De Block M, Van de Steene N, van de Cotte B, Metzlauff M, Van Breusegem F** (2007) Silencing of poly(ADP-ribose) polymerase in plants alters abiotic stress signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15150–5
- Vaseva I, Todorova D, Malbeck J, Travnickova A, Machackova I** (2008) Response of cytokinin pool and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity to abscisic acid exhibits organ specificity in peas | Institute of Experimental Botany AS CR. *Acta Physiol Plant* **30**: 151–155
- Vescovi M, Zaffagnini M, Festa M, Trost P, Lo Schiavo F, Costa A** (2013) Nuclear accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cadmium-stressed Arabidopsis roots. *Plant Physiol* **162**: 333–46
- Vigani G, Zocchi G** (2009) The fate and the role of mitochondria in Fe-deficient roots of strategy I plants. *Plant Signal Behav* **5**: 375–379
- Vincenz M, Caboche M** (1991) Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *EMBO J* **10**: 1027–35
- Vishwakarma A, Bashyam L, Senthilkumaran B, Scheibe R, Padmasree K** (2014) Physiological role of AOX1a in photosynthesis and maintenance of cellular redox homeostasis under high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* **81**: 44–53
- Vitor SC, Duarte GT, Saviani EE, Vincenz MGA, Oliveira HC, Salgado I** (2013) Nitrate reductase is required for the transcriptional modulation and bactericidal activity of nitric oxide during the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae*. *Planta* **238**: 475–86
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF** (2009) Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 177–206
- De Vos M, Jander G** (2009) *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **32**: 1548–60
- De Vos M, Kim JH, Jander G** (2007) Biochemistry and molecular biology of *Arabidopsis*-aphid interactions. *Bioessays* **29**: 871–83
- Voss I, Sunil B, Scheibe R, Raghavendra AS** (2013) Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biol (Stuttg)* **15**: 713–22
- Wagner R, Feth F, Wagner KG** (1986a) Regulation in tobacco callus of enzyme activities of the nicotine pathway: II. The pyridine-nucleotide cycle. *Planta* **168**: 408–13
- Wagner R, Feth F, Wagner KG** (1986b) The pyridine-nucleotide cycle in tobacco: Enzyme activities for the recycling of NAD. *Planta* **167**: 226–32

- Wagner R, Wagner KG** (1985) The pyridine-nucleotide cycle in tobacco Enzyme activities for the de-novo synthesis of NAD. *Planta* **165**: 532–7
- Waller GR, Yang KS, Gholson RK, Hadwiger LA, Chaykin S** (1966) The pyridine nucleotide cycle and its role in the biosynthesis of ricinine by *Ricinus communis* L. *J Biol Chem* **241**: 4411–8
- Waller JC, Dhanoa PK, Schumann U, Mullen RT, Snedden WA** (2010) Subcellular and tissue localization of NAD kinases from *Arabidopsis*: compartmentalization of de novo NADP biosynthesis. *Planta* **231**: 305–17
- Wallström S V, Florez-Sarasa I, Araújo WL, Aidemark M, Fernández-Fernández M, Fernie AR, Ribas-Carbó M, Rasmusson AG** (2014) Suppression of the external mitochondrial NADPH dehydrogenase, NDB1, in *Arabidopsis thaliana* affects central metabolism and vegetative growth. *Mol Plant* **7**: 356–68
- Wang C, Gao F, Wu J, Dai J, Wei C, Li Y** (2010) *Arabidopsis* putative deacetylase AtSRT2 regulates basal defense by suppressing PAD4, EDS5 and SID2 expression. *Plant Cell Physiol* **51**: 1291–9
- Wang G, Pichersky E** (2007) Nicotinamidase participates in the salvage pathway of NAD biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* **49**: 1020–1029
- Wang H, Wolosker H, Pevsner J, Snyder SH, Selkoe DJ** (2000) Regulation of rat magnocellular neurosecretory system by D-aspartate: evidence for biological role(s) of a naturally occurring free D-amino acid in mammals. *J Endocrinol* **167**: 247–52
- Wang K, Conn K, Lazarovits G** (2006) Involvement of quinolinate phosphoribosyl transferase in promotion of potato growth by a *Burkholderia* strain. *Appl Environ Microbiol* **72**: 760–8
- Warburg O, Christian W** (1936) Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten. *Helv Chim Acta* **19**: E79–E88
- Ward JL, Forcat S, Beckmann M, Bennett M, Miller SJ, Baker JM, Hawkins ND, Vermeer CP, Lu C, Lin W, et al.** (2010) The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato.
- Warren NG, Body BA, Dalton HP** (1983) An improved reagent for mycobacterial nitrate reductase tests. *J Clin Microbiol* **18**: 546–9
- Ward JL, Forcat S, Beckmann M, Bennett M, Miller SJ, Baker JM, Hawkins ND, Vermeer CP, Lu C, Lin W, et al.** (2010) The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant J* **63**: 443–57
- Weigel D, Glazebrook J** (2002) *Arabidopsis*: A Laboratory Manual. 354

- Wilder JP, Sae-Lee JA, Mitchell ED, Gholson RK** (1984) The L-aspartate oxidase reported to be present in higher plants is actually glutamic oxaloacetic transaminase. *Biochem Biophys Res Commun* **123**: 836–41
- Wilkinson S, Davies WJ** (2008) Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. *J Exp Bot* **59**: 619–31
- Willeke U, Heeger V, Meise M, Neuhann H, Schindelmeiser I, Vordemfelde K, Barz W** (1979) Mutually exclusive occurrence and metabolism of trigonelline and nicotinic acid arabinoside in plant cell cultures. *Phytochemistry* **18**: 105–110
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC** (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 1517–29
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW** (1994) Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* **193**: 530–535
- Wolosker H, D'Aniello A, Snyder S.** (2000) d-Aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. *Neuroscience* **100**: 183–189
- Woo KC** (1983) Effect of Inhibitors on Ammonia-, 2-Oxoglutarate-, and Oxaloacetate-Dependent O₂ Evolution in Illuminated Chloroplasts. *Plant Physiol* **71**: 112–117
- Woo KC, Boyle FA, Flugge IU, Heldt HW** (1987) N-ammonia assimilation, 2-oxoglutarate transport, and glutamate export in spinach chloroplasts in the presence of dicarboxylates in the light. *Plant Physiol* **85**: 621–5
- Woo R, Daniels-Kush R, Horton ES** (1985) Regulation of energy balance. *Annu Rev Nutr* **5**: 411–33
- Wu J, Neimanis S, Heber U** (1991) Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition. *Bot acta* **104**: 283–291
- Wu X, Oh M-H, Schwarz EM, Larue CT, Sivaguru M, Imai BS, Yau PM, Ort DR, Huber SC** (2011) Lysine acetylation is a widespread protein modification for diverse proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* **155**: 1769–78
- Wu Y, Kuzma J, Maréchal E, Graeff R, Lee HC, Foster R, Chua NH** (1997) Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* **278**: 2126–30
- Xia X-J, Wang Y-J, Zhou Y-H, Tao Y, Mao W-H, Shi K, Asami T, Chen Z, Yu J-Q** (2009) Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiol* **150**: 801–14

- Xing S, Poirier Y** (2012) The protein acetylome and the regulation of metabolism. *Trends Plant Sci* **17**: 423–30
- Yamamoto Y** (1963) Pyridine Nucleotide Content in the Higher Plant. Effect of Age of Tissue. *Plant Physiol* **38**: 45–54
- Yamasaki H, Sakihama Y** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* **468**: 89–92
- Yang S, Vanderbeld B, Wan J, Huang Y** (2010) Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Mol Plant* **3**: 469–90
- Yang Z, Savchenko A, Yakunin A, Zhang R, Edwards A, Arrowsmith C, Tong L** (2003) Aspartate dehydrogenase, a novel enzyme identified from structural and functional studies of TM1643. *J Biol Chem* **278**: 8804–8
- Yin Y, Ashihara H** (2007) Involvement of rapid nucleotide synthesis in recovery from phosphate starvation of *Catharanthus roseus* cells. *J Exp. Bot.* **58**: 1025–33
- Yin Y, Matsui A, Sakuta M, Ashihara H** (2008) Changes in pyridine metabolism profile during growth of trigonelline-forming *Lotus japonicus* cell cultures. *Phytochemistry* **69**: 2891–8
- Yin Y, Shimano F, Ashihara H** (2007) Involvement of rapid nucleotide synthesis in recovery from phosphate starvation of *Catharanthus roseus* cells. *J Exp Bot* **58**: 1025–33
- Ying W, Garnier P, Swanson RA** (2003) NAD⁺ repletion prevents PARP-1-induced glycolytic blockade and cell death in cultured mouse astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **308**: 809–13
- Yoshida A, Dave V** (1975) Inhibition of NADP-dependent dehydrogenases by modified products of NADPH. *Arch Biochem Biophys* **169**: 298–303
- Yoshie Y, Goto K, Takai R, Iwano M, Takayama S, Isogai A, Che F-S** (2002) Function of the rice gp91phox homologs *OsrbohA* and *OsrbohE* genes in ROS-dependent plant immune responses. *Plant Biotechnol* **22**: 127–135
- Yoshimura K, Ogawa T, Tsujimura M, Ishikawa K, Shigeoka S** (2014) Ectopic Expression of the Human MutT-Type Nudix Hydrolase, hMTH1, Confers Enhanced Tolerance to Oxidative Stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. doi: 10.1093/pcp/pcu083
- Yoshimura K, Ogawa T, Ueda Y, Shigeoka S** (2007) AtNUDX1, an 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, is responsible for eliminating oxidized nucleotides in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **48**: 1438–49

- Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JDG, Doke N** (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **15**: 706–18
- Zagdanska B** (1990) NAD kinase activity in wheat leaves under water deficit. *Acta Biochim Pol* **37**: 385–389
- Zagdanska B, Kozdoj J** (1994) Water stress-induced changes in morphology and anatomy of flag leaf of spring wheat. *Acta societatis Bot Pol* **63**: 61–66
- Zeier J** (2013) New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ* **36**: 2085–103
- Zelitch I, Schultes NP, Peterson RB, Brown P, Brutnell TP** (2009) High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. *Plant Physiol* **149**: 195–204
- Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, et al** (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* **1**: 175–85
- Zhang Q, Piston DW, Goodman RH** (2002) Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science* **295**: 1895–7
- Zhang SQ, Outlaw WH** (2001) Abscisic acid introduced into the transpiration stream accumulates in the guard-cell apoplast and causes stomatal closure. *Plant, Cell Environ* **24**: 1045–1054
- Zhang T, Berrocal JG, Yao J, DuMond ME, Krishnakumar R, Ruhl DD, Ryu KW, Gamble MJ, Kraus WL** (2012) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent gene expression through promoter-directed recruitment of a nuclear NAD⁺ synthase. *J Biol Chem* **287**: 12405–16
- Zhang X, Mou Z** (2009) Extracellular pyridine nucleotides induce PR gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant J* **57**: 302–12
- Zhang X, Mou Z** (2012) Expression of the human NAD(P)-metabolizing ectoenzyme CD38 compromises systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 1209–18
- Zhang X-C, Li M-Y, Ruan M-B, Xia Y-J, Wu K-X, Peng M** (2013) Isolation of AtNUDT5 gene promoter and characterization of its activity in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Appl Biochem Biotechnol* **169**: 1557–65
- Zheng X-Q, Hayashibe E, Ashihara H** (2005) Changes in trigonelline (N-methylnicotinic acid) content and nicotinic acid metabolism during germination of mungbean (*Phaseolus aureus*) seeds. *J Exp Bot* **56**: 1615–23

- Zheng X-Q, Koyama Y, Nagai C, Ashihara H** (2004) Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits. *J Plant Physiol* **161**: 363–9
- Zheng X-Q, Matsui A, Ashihara H** (2008) Biosynthesis of trigonelline from nicotinate mononucleotide in mungbean seedlings. *Phytochemistry* **69**: 390–5
- Zhong X, Zhang H, Zhao Y, Sun Q, Hu Y, Peng H, Zhou D-X** (2013) The rice NAD(+)-dependent histone deacetylase OsSRT1 targets preferentially to stress- and metabolism-related genes and transposable elements. *PLoS One* **8**: e66807
- Zhu X-G, de Sturler E, Long SP** (2007) Optimizing the distribution of resources between enzymes of carbon metabolism can dramatically increase photosynthetic rate: a numerical simulation using an evolutionary algorithm. *Plant Physiol* **145**: 513–26
- Zhu X-G, Long SP, Ort DR** (2008) What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Curr Opin Biotechnol* **19**: 153–9
- Zhu Y, Eiteman MA, Altman R, Altman E** (2008) High glycolytic flux improves pyruvate production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6649–55
- Zielinska W, Barata H, Chini EN** (2004) Metabolism of cyclic ADP-ribose: Zinc is an endogenous modulator of the cyclase/NAD glycohydrolase ratio of a CD38-like enzyme from human seminal fluid. *Life Sci* **74**: 1781–90
- Zimmermann P, Hirsch-hoffmann M, Hennig L, Gruissem W** (2004) GENEVESTIGATOR . *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox 1 [w]. *Bioinformatics* **136**: 2621–2632

Annexes

Annexes

Annexe 1. Séquence codante et séquence protéique de la L-aspartate oxydase.

atggcgggctcatgtttctactggaaacattcataatctctatcttgcggggcaggtttac
 M A A H V S T G N I H N F Y L A G Q V Y
 aggggacaagctttttcatggagttctgcttctactttcatggcaaatccattcaaagag
 R G Q A F S W S S A S T F M A N P F K E
 ccctcttgggtcaagtggggtatttaaggctctaaaagctgagagatgtggttgttactct
 P S W S S G V F K A L K A E R C G C Y S
 cgtggatcttccccatcagtgagacctcaaaacctatcagggctgtttcggatcttct
 R G I S P I S E T S K P I R A V S V S S
 tcaacaaagtattatgatttctactgtgattggtagtggagtagcgggtctgcttattgct
 S T K Y Y D F T V I G S G V A G L R Y A
 ttagaagttgcaagcaaggaacagtcgcagtgattaccaaagatgagcctcatgagagt
 L E V A K T V A V I T K D E P H E S
 aacacaaactatgctcaaggtggtgtagtggctgtggtatgcccttggattctgttgaa
 N T N Y A Q G G V S A V L C P L D S V E
 agtcatacgccgagactatggtcgctggtgctcatcttggatgaagaaaccgtaaga
 S H M R D T M V A G A H L C D E E T V R
 gttgtgtgactgaagggcctgaaaggattcgtgaactgattgcaatgggagcatcatt
 V V C T E G P E R I R E L I A M G A S F
 gatcacggcgagagatgaaatcttgcatttggccagagaggggtgctcactcgcattgtagg
 D H G E D G N L H L A R E G G H S H C R
 atcgttccagctgctgatgatgacaggaagagagattgagagagcttacttgaagctgta
 I V H A A D M T G R E I E R A L L E A V
 cttaatgatcccaacatctgtcttcaaacaccattttgcaatcgatctgctcacttct
 L N D P N I S V F K H H F A I D L L T S
 caggatggcttgaacacagtttgcctggtggtgacactttgaaatcaaaaactaatgag
 Q D G L N T V C H G V D T L N I K T N E
 gtagtacgctttatctgaaggtgacattgcttgcctcaggtggagctgggcatatctat
 V V R F I S K V T L L A S G G A G H I Y
 ccatcaaccacaaatcctctggtggctactggagatgggatggcgatggctcatcgagct
 P S T T N P L V A T G D G M A M A H R A
 caagctgtgatctcaaatatggaatgtgagcttctcactgcccagcagcagaa
 Q A V I S N M E F V Q F H P T A L A D E
 ggtcttcccatcaaaactcaaaactgctagggaaaacgcttccatcaccgagggcgggt
 G L P I K L Q T A R E N A F L I T E A V
 agaggtgatgggtggcatcctctataatctaggaatggagcagattcatgctgtttacgat
 R G D G I L Y N L G M E R F M P V Y D
 gaacagctgagcttgcctcaagagagcgtgggtgcaagaagtattgatgaccagcttaag
 E R A E L A P R D V V A R S I D D Q L K
 aaacgaaacgaaaagtatgtgttacttgacataagccataagccaagagaaaagattctt
 K R N E K Y V L L D I S H K P R E K I L
 gccatttcccgaacatagcttctgaaatgtcttaaacacgggtcggatcaccgccagcag
 A H F P N I A S E C L K H G L D I T R Q
 cctattccgggttgcctgcagcccattacatgtgtggaggagtctcgtgctggtttacaa
 P I P V P V A A H Y M C G G V R A G L Q
 ggcgaaacaaatgctccttggattgtttagcaggtgaaagtacagcagcctccac
 G E T N V L G L F V A G E V A C T G L H
 ggggcaaatcgtctgttagtaactcgttttagaagctctggttttcgagagcgggct
 G A N R L A S N S L L E A L V F A R R A
 gttcagccttcgactgagctcatgaaacgcacaagacttgatgtatgagcagcagagaaa
 V Q P S T E L M K R T R L D V C A S E K
 tggacaaggcctgttgttgcgacagctagattgctaggagatgaagtaaatagcaagatt
 W T R P V V A T A R L L G D E V I A K I
 atagctttagactaaagaagtgaagagagcttcaggaggtaatgtggaagtatggttgg
 I A L T K E V R R E L Q E V M W K Y V G
 attgtcagatcgacaattcggctcaccactgctgagagagaaaatcgagagctagaagca
 I V R S T I R L T T A E R K I A E L E A
 aaatgggaaacatttttggatggaacagtggaacaaacagtggtgtagctcttgaagct
 K W E T F L F E H G W E Q T V V A L E A
 tgtgagatgagaaactgttctgttgcgctaagcttgggtgagcagcggcttagctaga
 C E M R N L F C C A K L V S S A L A R
 catgaaagcagaggtcttaccatgacagactttccttttgggaagaaagcaagcgg
 H E S R G L H Y M T D F P F V E E S K R
 attccgagcagattattctaccgcttctcctacaacagctagttggagctcaagcgggta
 I P T I I L P S S P T T A S W S S R R L
 cagaatataagtagcagctcacttattgattgctaa
 Q N I S S S S L I D C -

Annexe 2. Amorces utilisées pour la génération des lignées 35S ::AO.

amorce sens GAG AGA CCC GGG ATG GCG GCT CAT GTT TCT AC

amorce reverse GAG AGA CAG CTG AAT CGT TAG TTA TTC ACT CGA C

Annexe 3. Amorces pour le géotypage des lignées mutantes *mAO*

a) Mutant *mAO1* (SAIL_1145_B10)

Amorce Reverse (RP <i>mAO1</i>)	TTA CAA GGC GAA ACC AAT GTC	GCG CAA CAG AAC AAG TTT CTC
Amorce Sens (LP <i>mAO1</i>)	GCC TTT TCA GAA ATG GAT AAA TAG CCT TGC TTC C	TTT TGC TAA ATT CGG TTG TGC
Amorces de bordure gauche de l'ADN-T (LB3)	GCT GTT CTA AAG CGA CAT TGC	ATT TTG GCG ATT TCG GAA C

b) Mutant *mAO2* (SALK_013920C)

Amorce Reverse (RP <i>mAO2</i>)	GCG CAA CAG AAC AAG TTT CTC
Amorce Sens (LP <i>mAO2</i>)	TTT TGC TAA ATT CGG TTG TGC
Amorce de bordure gauche de l'ADN-T (Lbb)	ATT TTG CCG ATT TCG GAA C

Annexe 4. Amorces utilisées pour les analyses par qRT-PCR.

Abréviations	Nom du gène	AGI code	Amorce Sens	Amorce Reverse
Act2	Actine 2	At3g48780	CTGTACGGTAACATTGTGCTCAG	CCGATCCAGACACTGTACTTCC
AO	L-Aspartate oxydase	At5g14760	GATCGTTTACGCTGCTGATA	GTGTTCAAGCCATCCTGAG
ICS1	Isochorismate synthase 1	At1g74710	GCTCTATCATTTCATCTCTCGTAG	CATTCATAGACATCGAACATGACTC
NIA1	Nitrate réductase 1	At1g77760	GGTAACGAGGGTTGAGGTGA	ACCAGCACCAGAATTTACCG
NIA1	Nitrate réductase 2	At1g37130	CTTACAAACCTCCCGTTCCA	GTCATGAACCTTGGCTGGTT
PR-1	Pathogenesis related protein 1	At2g14610	CTCATACACTCTGGTGGG	TTGGCACATCCGAGTC
PR-5	Pathogenesis related protein 5	At1g75040	ACTGTGGCGGTCTAAG	CGTGGGAGGACAAGTTT
WRKY70	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 70	At3g56400	GCTCTTGGGAGTTTCTGCGTT G	AGCTCGAACCCAAG ATGTTTCAAG