



HAL
open science

Régulation du métabolisme carboné sous ozone : rôles de la PhosphoEnolPyruvate carboxylase (PEPC) et des enzymes NADP-dépendantes

Ata Allah Dghim

► To cite this version:

Ata Allah Dghim. Régulation du métabolisme carboné sous ozone : rôles de la PhosphoEnolPyruvate carboxylase (PEPC) et des enzymes NADP-dépendantes. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0313 . tel-01749657

HAL Id: tel-01749657

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749657>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
Collégium Sciences Technologies
Pôle Scientifique Agronomie, Agroalimentaire, Forêt
Ecole Doctorale : Ressources Procédés Produits Environnement
RP2E

Doctorat

Pour l'obtention du grade de docteur en biologie végétale et forestière

Ata Allah DGHIM

**Régulation du métabolisme carboné sous ozone :
rôles de la Phosphoenolpyruvate carboxylase(PEPC)
et des enzymes NADP-dépendantes.**

Soutenance prévue: 07/12/2012

Direction de thèse et encadrement : Professeur Yves JOLIVET, UL

Co-Directeur de thèse : Professeur Pierre DIZENGREMEL, UL

Jury

| | |
|--|---------------------|
| Pr Anne REPELLIN, UMR BioEMCo, UPEC | Rapporteur |
| Dr Emmanuel BAUDOUIN, MCU HDR, LPCMP, UR5-UPMC-Paris 6 | Rapporteur |
| Pr Graham NOCTOR, UMR 8618, IPB, Université Paris Sud | Examineur |
| Dr Didier LE THIEC, CR HDR, UMR 1137 EEF, INRA- Nancy | Examineur |
| Pr Pierre DIZENGREMEL, UMR 1137 EEF, UL | Examineur/Encadrant |
| Pr Yves JOLIVET, UMR 1137 EEF, UL | Examineur/Encadrant |

UMR1137 INRA/UL, Ecologie et Ecophysologie Forestières,
Equipe Physiologie de la Diversité de la réponse aux Contraintes
Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine
F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France

الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

Je tiens dans un premier temps à remercier Yves Jolivet, parce qu'il m'a encadrer, soutenu et guider depuis mon arrivée sur Nancy jusqu'au jour de mon départ, parce qu'il était compréhensif et patient de mes humeurs changeantes, mes idées farfelues et quelque fois ma grande paresse. Merci infiniment Yves.

Je tiens à remercier Pierre Dizengremel, qui m'a ouvert les portes de son labo, pour ses grands conseils et ses corrections apportées à ce manuscrit et aux différentes publications. Je vous souhaite une agréable retraite chef.

Un très grand merci à Marie-Paule Hasenfratz-Sauder, pour son aide précieuse au cours des manip, mais particulièrement pour toutes les corrections, sans lesquelles ce manuscrit n'aurait pas abouti.

Merci à Didier Le Thiec, pour sa patience et son encadrement lors des mesures des échanges gazeux, et avoir accepté d'être dans mon jury de thèse. J'aurais aimé être à la hauteur des ces attentes.

Je tiens à remercier Marie-Noëlle Vaultier, pour toute l'aide qu'elle a pu apporter aux différents manip ainsi qu'à la rédaction du premier papier.

Je tiens à remercier Pr. Anne Repellin et Dr. Emmanuel Baudouin d'avoir accepté de juger ce mémoire en tant que rapporteurs.

Un très grand merci à Pr. Graham Noctor et Amna Mhamdi pour avoir participé à l'aboutissement du travail réalisé dans le deuxième chapitre de ce mémoire.

Les mots ne peuvent pas exprimer ma gratitude pour l'équipe du 5^{ème}. Joëlle et Nicolas pour leur aide et soutien au labo. Jean-Paule, Dany et Mireille pour l'organisation et l'encadrement de mes enseignements. Dominique, pour ces conseils précieux. Jacques et Stéphane pour l'aide dans les chambres phytotroniques et les fumigations. Elisabeth, pour son sourire agréable. Daniel pour ces encouragements. Enfin Lysiane, pour son travail minutieux.

Un grand merci à Jennifer pour son aide lors de la première manip sur les peupliers. Je remercie tout les thésards et les stagiaires rencontrés lors de cette aventure sur Nancy.

Je souhaite dédier toute cette thèse ma famille, sans qui je ne serais personne.

Un immense merci à Emily qui était toujours là pour moi.

Je remercie tout mes ami(e)s et toutes les personnes que j'ai pu côtoyer sur Nancy.

Le travail expérimental présenté dans ce mémoire de thèse a été réalisé sous la responsabilité du Pr. Yves Jolivet et du Pr. Pierre Dizengremel dans l'équipe Physiologie de la diversité de la réponse aux contraintes de l'UMR Écologie et Écophysiologie Forestières INRA/Université de Lorraine à Vandoeuvre-lès-Nancy.

Une partie du travail présenté dans le chapitre n°2 a été effectué par Amna Mhamdi, post-doctorant à l'Institut de Biologie des Plantes, UMR 8618, Université ParisSud, Orsay, sous la responsabilité du Pr. Graham Noctor.

.

3-PGK : 3-Phosphoglycérate kinase
A : assimilation nette de CO₂
ACC 1-aminocyclopropane-1-carboxilique
ACO : ACC oxydase
ACS : 1-aminocyclopropane-1-carboxilique synthase
ADNc : ADN complémentaire (d'un ARN messager)
AMS : S-adénosylméthionine synthétase
AMS : S-adénosylméthionine synthétases
AOC : l'oxyde d'allène cyclase
AOS : l'oxyde synthétase
AOT40 : *accumulated ozone exposure over a threshold of 40 ppb* (moyennes horaires cumulées de concentration en ozone au-dessus de 40 ppb)
APMSF : (4-aminodinophényl) méthane sulfonyl-fluoride
APX : ascorbate peroxydase
ASA : ascorbate
ATP : adénosine triphosphate
Bicine : N,N-bis (2-hydroxyéthyl)-glycine
CAD : Cinnamyl alcool déshydrogénase
CAD : cinnamyle alcool déshydrogénase
CAT : catalase
CCI : *chlorophyll content index* (indice de teneur en chlorophylles totales)
CFC : chlorofluorocarbones
Chl : chlorophylles totales
CHS : chalcone synthétase
CHS : chalcone synthétase
CP : créatine phosphate
CPK : créatine phosphokinase
CUO : *cumulative uptake of ozone* (flux stomatique cumulé d'ozone)
DHA : déhydroascorbate
DHAR : déhydroascorbate réductase
DMSO : diméthyle sulfoxyde
DTT : dithiothréitol
EDTA : acide éthylène bis(b-aminoéthyléther)N,N,N',N'-tétraacétique
EGTA : acide éthylène glycol-bis(b-aminoéthyléther)N,N,N',N'-tétraacétique
ET : éthylène
FBPase : fructose 1,6-bisphosphatase
Fd : ferrédoxine
FJ : feuilles jeunes
FM : feuilles matures
FO₃ : flux stomatique d'ozone
FTR : ferrédoxine thiorédoxine réductase
G6P : glucose 6-phosphate
G6PDH : glucose 6-phosphate déshydrogénase
Gal-3-P : glyceraldéhyde 3-phosphate
GAPDH : glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GDC : glycine décarboxylase
gO₃ : conductance stomatique pour l'ozone
Gpx : glutathion peroxydase
GR : glutathion réductase
Grx : glutarédoxine

g_s : conductance stomatique pour la vapeur d'eau
 GS : glutamine synthétase
 GSH/GSSG : glutathion réduit/oxydé
 GST : glutathion S-transférase
 HEPES : N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N-(2-éthane sulfonate)
 HR : *Hypersensitive Reaction*, réponse hypersensible
 JA : acide jasmonique
 LOX : lipoxygénase
 MAP kinase : *mitogen activated protein kinase*
 ME : enzyme malique NADP-dépendante
 MDH : malate déshydrogénase
 MDHA : monodéhydroascorbate
 MDHAR : monodéhydroascorbate réductase
 NAD(P)/H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme oxydée / forme réduite
 NO : monoxyde d'azote, oxyde nitrique
 NO_x : oxydes d'azote
 NTR : NADPH thiorédoxine réductase
 O_3 : ozone
 OAA : acide oxaloacétique
 OPP : voie des pentoses phosphates
 PCR : *polymerase chain reaction*, amplification en chaîne par polymérase)
 PEP : phosphoénolpyruvate
 PEPc : phosphoénolpyruvate carboxylase
 P_i : phosphate inorganique
 PMT : pinosylvine méthyl-transférase
 POD : peroxydases
 POD_Y : *phytotoxic ozone dose above a threshold of Y*, dose phytotoxique de l'ozone supérieur à un seuil Y.
 ppb : parties par milliards, en volume
 PPFD : *photosynthetic photon flux density*, densité de flux de photons photosynthétiques)
 PP_i : pyrophosphate
 ppm : parties par millions, en volume
 Prx : peroxyrédoxine
 PTPC : *plant type PEPC*, PEPC chez les plantes
 RNS : *reactive nitrogen species* (espèces réactives nitrogénées)
 ROS : *reactive oxygen species* (espèces réactives de l'oxygène)
 RT-PCR : *retrotranscription-polymerase chain reaction*
 Rubisco : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase
 RuBP : ribulose 1,5 bisphosphate
 SA : acide salicylique
 SAB : sérum albumine bovine
 SOD : superoxyde dismutase
 Srx : sulfirédoxine
 STS : stilbène synthétase
 STS : stillbène synthétase, pinosylvine
 SUM00 : moyennes horaires cumulées de concentration en ozone
 TCA : acide trichloroacétique
 Tris : tris (hydroxyméthyl) aminométhane
 Trx : thiorédoxine
 UV : ultraviolet
 VOC : *volatile organic compounds*, composés organiques volatils
 ϵ : coefficient d'extinction molaire

| | |
|--|----|
| Figure 1. Représentation schématique d'une molécule d'ozone. | 10 |
| Figure 2. Distribution des concentrations en ozone dans l'atmosphère terrestre. | 10 |
| Figure 3. Cycle de l'ozone troposphérique depuis sa formation jusqu'à son dépôt. | 12 |
| Figure 4. Historique et prévision des concentrations troposphériques en ozone de 1840 à 2100. | 14 |
| Figure 5. Relation entre le rendement relatif du blé (A) et de la pomme de terre (B) et la dose cumulée d'ozone décrit par l'indice POD_6 | 16 |
| Figure 6. Effets de l'ozone sur un ensemble de processus physiologiques et son impact sur la végétation. . | 18 |
| Figure 7. Effet de l'ozone sur la croissance d'organes reproducteurs. | 22 |
| Figure 8. Pénétration de l'ozone atmosphérique dans la chambre sous- stomatique et sa transformation en ROS. | 24 |
| Figure 9. Principe de base de la S-nitrosylation. | 28 |
| Figure 10. Schéma simplifié de la réponse cellulaire à l'ozone. | 36 |
| Figure 11. Deux voies possibles de biosynthèse de l'acide salicylique (SA) dans les plantes exposées à l'ozone. | 40 |
| Figure 12. Voie possible de biosynthèse et de signalisation de l'éthylène dans les plantes sous ozone. | 42 |
| Figure 13. Voies possibles de biosynthèse et de signalisation de l'acide jasmonique dans les plantes sous ozone. | 44 |
| Figure 14. Réaction d'oxydation de l'ascorbate (ASA) en déhydroascorbate (DHA), après réaction avec une molécule de peroxyde d'hydrogène. | 48 |
| Figure 15. Réaction d'oxydation de l'ascorbate dans l'apoplasme et le symplasme dans une cellule végétale sous ozone. | 50 |
| Figure 16. Réaction catalysée par la glutathion réductase (NADP-dépendante). | 52 |
| Figure 17. Effets de l'ozone sur les voies métaboliques et les enzymes associées au métabolisme carboné des arbres. | 54 |
| Figure 18. Le rôle central du phosphoénolpyruvate dans le fonctionnement des différentes voies métaboliques. | 56 |
| Figure 19. Schéma métabolique représentant le phosphoénolpyruvate (PEP) au coeur de différentes voies associées qui peuvent être affectées par l' O_3 | 58 |
| Figure 20. Réaction catalysée par la GAPDH NADP-dépendante (cGAPDH), shunt au sein des réactions de la glycolyse chez les plantes. | 60 |
| Figure 21. Schéma représentant le positionnement de la cG6PDH au sein du métabolisme carboné. | 66 |
| Figure 22. Représentation schématique du positionnement des plants de peupliers à l'intérieur des chambres phytotroniques lors de la première expérimentation. | 76 |
| Figure 23. Représentation schématique du positionnement des plants de peuplier (géotypes <i>Carpaccio</i> et <i>Robusta</i>) lors de deuxième expérimentation. | 76 |
| Figure 24. Représentation schématique du dispositif de fumigation. | 78 |
| Figure 25. Représentation schématique des plants de peuplier et des feuilles échantillonnées à différents dates de prélèvements. | 86 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 1. Effet de l’ozone sur plusieurs espèces végétales sur la base de niveaux critiques de flux d’ozone entrant. | 16 |
| Tableau 2. Sélection de protéines S-nitrosylées citées dans la littérature dans différentes espèces de plantes. La position des cystéines S-nitrosylés est donnée quand elle est connue..... | 34 |
| Tableau 3. Effet d’une exposition de trois semaines à une dose journalière d’ozone de 120 ppb pendant 13h sur quelques paramètres de croissance et physiologiques de dix génotypes de peuplier euraméricain. | 116 |

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE & OBJECTIFS DE LA THÈSE | 1 |
| 2. ÉTAT DE L'ART | 9 |
| 2.1. GÉNÉRALITÉS SUR L'OZONE | 11 |
| 2.2. Évolution des concentrations d'ozone dans la troposphère | 13 |
| 2.3. Évolution des indices et seuils critiques d'exposition à l'ozone chez les végétaux | 15 |
| 2.4. Impact de l'ozone sur la végétation | 19 |
| 2.5. Les mécanismes d'action de l'ozone à l'échelle cellulaire | 23 |
| 2.1.1 Entrée de l'ozone dans les feuilles | 23 |
| 2.1.2 Production de ROS | 25 |
| 2.1.3 Ozone et monoxyde d'azote | 27 |
| 2.1.3.1 Le monoxyde d'azote | 29 |
| 2.1.3.2 Mécanismes de S-nitrosylation | 31 |
| 2.1.3.3 Fonctions des protéines S-nitrosylées | 33 |
| 2.1.4 Ozone et transduction du signal | 37 |
| 2.1.4.1 L'acide salicylique et l'induction de la mort cellulaire | 41 |
| 2.1.4.2 Rôle de l'éthylène dans la propagation de la mort cellulaire | 43 |
| 2.1.4.3 L'acide jasmonique aide à contenir des lésions | 45 |
| 2.1.5 Mécanismes de détoxification des ROS : de l'apoplasme au symplasme | 47 |
| 2.1.6 Effet de l'ozone sur le métabolisme carboné primaire | 55 |
| 2.1.6.1 Processus photosynthétique et respiratoires | 55 |
| 2.1.6.2 La respiration mitochondriale | 55 |
| 2.1.6.3 La voie MEP | 57 |
| 2.1.6.4 Les voies shikimate et phénylpropanoïdes | 57 |
| 2.1.6.5 La voie anaplérotique | 57 |
| 2.1.7 Glycolyse et voie des pentoses phosphates | 61 |
| 2.1.8 Enzymes étudiées | 61 |
| 2.1.8.1 La phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) chez plantes C3 | 61 |
| 2.1.8.2 L'enzyme malique NADP-dépendante (NADP-ME) | 65 |
| 2.1.8.3 La glucose-6-phosphate déshydrogénase (cG6PDH) | 67 |
| 2.1.8.4 L'isocitrate déshydrogénase NADP dépendante (cICDH) | 69 |
| 2.1.8.1 NADP-glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase | 71 |
| 3. MATÉRIELS & MÉTHODES | 75 |
| 3.1. Matériel végétal et conditions de culture | 77 |
| 3.1.1. Chapitre n° 1 | 77 |
| 3.1.1.1. Matériel végétal utilisé | 77 |
| 3.1.1.2. Conditions de culture | 77 |
| 3.1.2. Chapitre n° 2 | 77 |
| 3.1.2.1. Matériel végétal utilisé | 77 |
| 3.1.2.2. Conditions de culture | 79 |
| 3.1.3. Chapitre n° 3 | 81 |
| 3.1.3.1. Matériel végétal utilisé | 81 |
| 3.1.3.2. Conditions de culture | 81 |
| 3.2. Fumigation à l'ozone | 81 |
| 3.2.1. Description du dispositif | 81 |
| 3.2.2. Fumigations et échantillonnages | 83 |
| 3.2.2.1. Chapitre n°1 | 83 |
| 3.2.2.1.1. Première phase : choix des géotypes de peupliers par leur réponse à l'O ₃ | 83 |
| 3.2.2.1.2. Deuxième phase : géotypes choisis | 85 |
| 3.2.2.2. Chapitre n° 2 | 89 |
| 3.2.2.3. Chapitre n°3 | 91 |
| 3.3. Extraction et dosage des protéines solubles | 91 |
| 3.3.1. Extraction et filtration des extraits végétaux | 91 |
| 3.3.2. Dosage des protéines solubles | 91 |

| | |
|---|------------|
| 3.4. Dosages enzymatiques | 93 |
| 3.4.1. Rubisco, activité carboxylase totale (EC 4.1.1.39) | 93 |
| 3.4.2. Phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) | 95 |
| 3.4.3. Malate déshydrogénase à NAD (NAD-MDH EC 1.1.1.37) | 95 |
| 3.4.4. Enzyme malique à NADP (NADP-ME, EC 1.1.1.40) | 95 |
| 3.4.5. Isocitrate déshydrogénase cytosolique à NADP (ciCDH, EC 1.1.1.42) | 97 |
| 3.4.6. Glucose 6-phosphate déshydrogénase (cG6PDH, EC 1.1.1.49) | 97 |
| 3.4.7. Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylante NADP-dépendante (CE 1.2.1.9; cGAPDH) | 97 |
| 3.4.8. Expression des résultats | 99 |
| 3.5. Prédiction des cystéines S-nitrosylées avec GPS-NO 0.1 | 101 |
| 3.5.1. Principe des prédictions et algorithme | 101 |
| 3.5.2. Exemple | 103 |
| 3.6. Analyses statistiques | 105 |
| 3.6.1. Entrée de la bibliothèque R et des différentes données | 105 |
| 3.6.2. Traitement statistique | 105 |
| 3.6.2.1. Comparaison d'échantillons | 105 |
| 3.6.2.2. Comparaison des pentes de régressions | 109 |
| 3.6.2.3. Analyse en composantes principales | 111 |
| 3.7. Alignement de séquences | 113 |
| 4. CHAPITRE N°1 : Capacité de régénération du NADPH dans les feuilles de deux génotypes de Peuplier présentant des différences de sensibilité à l'ozone | 115 |
| 4.1. Introduction | 117 |
| 4.2. Publication | 119 |
| 5. CHAPITRE N° 2 : Importance de l'isocitrate déshydrogénase cytosolique et de la glutathion réductase 1 dans la réponse lumière-dépendante à l'ozone chez Arabidopsis | 149 |
| 5.1. Introduction | 151 |
| 5.2. Publication | 155 |
| 6. CHAPITRE N°3 : Contrôle du métabolisme carboné par NO dans les feuilles d'Arabidopsis exposées à l'ozone. | 195 |
| 6.1. Introduction | 197 |
| 6.2. Publication | 199 |
| 7. CONCLUSIONS & PERSPECTIVES | 235 |
| 8. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 245 |

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE & OBJECTIFS DE LA THÈSE

De nos jours, l'ozone (O₃) ambiant est considéré comme polluant secondaire de l'air avec un effet toxique pour les organismes terrestres (Booker *et al.*, 2009). Ce gaz à effet de serre contribue activement au changement climatique (Ehhalt *et al.*, 2001). Sa formation dans l'atmosphère, qui nécessite les rayonnements UV solaire, implique la présence de précurseurs chimiques primaires comme les oxydes d'azote (NO_x), hydrocarbures organiques volatils (VOCs, *Volatile Organic Compounds*) et le monoxyde de carbone. Avec l'avènement de la révolution industrielle au cours du siècle passé, les concentrations ambiantes en NO_x et VOC ont considérablement augmenté provoquant l'augmentation d'O₃ à des niveaux toxiques pour la végétation (Matyssek *et al.*, 2007).

Les concentrations d'O₃ actuelles ainsi que celles prévues pour l'avenir sont suffisamment élevées pour induire des changements physiologiques dans la végétation (Ashmore, 2005; Wittig *et al.*, 2007; Avnery *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2011). Ces changements incluent une apparition de lésions foliaires, une réduction de la photosynthèse (Fiscus *et al.*, 2005; Wittig *et al.*, 2007), une abscission accélérée des feuilles (Karnosky *et al.*, 1996; Nunn *et al.*, 2005) et une diminution des rendements (Percy *et al.*, 2009; Leisner & Ainsworth, 2011; Pleijel, 2011). La diminution de rendement touche plusieurs espèces horticoles et forestières avec des pertes économiques importantes (Holland *et al.*, 2006; Society & Fowler, 2008; Avnery *et al.*, 2011).

Pour les plantes, la phytotoxicité de l'O₃ dépend fortement du flux entrant dans le mésophylle, par les stomates, lors des échanges gazeux. Plusieurs approches (Grünhage *et al.*, 2001; Danielsson *et al.*, 2003; Grünhage *et al.*, 2004) qui utilisent un concept basé sur le flux d'O₃ pénétrant dans la feuille, ont été développées afin d'évaluer le risque sur la végétation. Bien qu'elles s'avèrent prometteuses, ces différentes approches présentent quelques limitations car elles ne tiennent pas compte des mécanismes de défense cellulaire de détoxification (Matyssek *et al.*, 2004). Ainsi, pour affiner le concept d'estimation de risque, la notion de "flux effectif d'O₃" a été récemment introduite. Cette dernière prend en considération, en plus de la conductance stomatique, la détoxification de l'O₃ à l'intérieur des feuilles (Eller & Sparks, 2006; Musselman *et al.*, 2006; Tausz *et al.*, 2007; Wieser & Matyssek, 2007). Même si cette notion de "flux effectif d'O₃" semble mieux appropriée, elle connaît encore des limites car elle ne prend pas en compte la régénération du pouvoir réducteur sous forme de NAD(P)H, important pour alimenter le système de détoxification de la plante (Dizengremel *et al.*, 2008; Dizengremel *et al.*, 2009).

Depuis une vingtaine d'années, notre laboratoire conduit des recherches qui s'inscrivent dans une dynamique internationale de recherche des effets de l'ozone sur la végétation. Dans le cadre de deux projets européens STEP « *Interactions between air pollutants, climatic and nutritional factors on coniferous tree physiology* », coordonnés par le Pr. Pierre Dizengremel, les études ont tout d'abord porté sur le métabolisme carboné sous ozone chez une espèce méditerranéenne, le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Par la suite le champ d'investigation s'est élargi à d'autres espèces et notamment le peuplier. Les premiers résultats ont souligné l'inhibition prononcée de l'activité ribulose-1,5-diphosphate carboxylase (Rubisco), conséquence d'une diminution de la quantité de la protéine mais également d'une diminution de l'expression des gènes codant pour les sous-unités de la protéine ainsi que des sous-unités de la Rubisco activase (Fontaine *et al.*, 1999; Pelloux *et al.*, 2001). Comme cette enzyme est la principale carboxylase capable de fixer le CO₂ atmosphérique chez les plantes C3, elle serait en partie responsable de la perte en capacité photosynthétique de ces plantes (Dizengremel *et al.*, 1994). Outre son rôle dans la photosynthèse, la Rubisco est impliquée dans le processus photorespiratoire. Dans les travaux de thèse de Bagard (2008), l'auteur suggère que la diminution de l'activité Rubisco serait à l'origine de la réduction de la photorespiration chez des peupliers exposés à l'O₃ (Bagard *et al.*, 2008). Les travaux de l'équipe ont également montré que l'inhibition de l'activité de la Rubisco est très souvent, concomitante à une stimulation de l'activité phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) (Dizengremel, 2001) résultant aussi pour une part d'une moindre synthèse de la protéine et de l'expression des gènes codant pour cette enzyme (Fontaine *et al.*, 2003). Contrairement à la Rubisco, la réponse de la PEPC semble être une réponse spécifique des plantes C3 sous ozone. Cette enzyme peut, *via* une voie anaplastique, approvisionner le cycle de Krebs en squelettes carbonés, pour soutenir la synthèse d'acides aminés qui peuvent être engagés dans les processus de défense et de réparation (Dizengremel *et al.*, 2009). Il a été également montré que sous O₃, l'augmentation de l'activité PEPC est souvent accompagnée d'une stimulation de l'activité de déshydrogénases NADP-dépendantes associées aux processus cataboliques [glycolyse, voie des pentoses phosphates (OPP)] (Dizengremel, 2001). Ces enzymes cytosoliques telles que l'enzyme malique (NADP-ME), l'isocitrate déshydrogénase (iCDH), la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (cGAPDH), la glucose-6-phosphate déshydrogénase (cG6PDH), sont capables de réduire le NADP en NADPH, cofacteur pour certaines enzymes du système de détoxification, en particulier la glutathion réductase (GR) du cycle Halliwell-Asada-Foyer.

Dans les dernières années, les travaux de notre équipe se sont orientés vers l'étude de processus de détoxification en particulier sur les variations des pool de métabolites ayant un rôle antioxydant (ascorbate, glutathion) avec également l'ambition d'étudier les capacités de régénération du pouvoir réducteur (NAD(P)H), dans le souci d'améliorer les seuils de risques à l'O₃ (Dizengremel *et al.*, 2008; Dizengremel *et al.*, 2009)

Sur cette thématique, l'équipe est actuellement impliquée dans le montage d'un projet européen. C'est dans ce contexte que mon sujet de thèse s'est positionné avec comme objectifs de mieux cerner l'importance de la régénération du pouvoir réducteur dans la réponse à l'ozone et de préciser les processus post-traductionnels qui pourraient modifier l'activité de la PEPC sous ozone. La formulation de ces objectifs peut être présentée sous la forme de trois questions essentielles qui constituent le cheminement de cette thèse et sa structuration en trois parties :

- La différence de sensibilité à l'ozone peut-elle être liée à des différences d'activité des déshydrogénases NADP-dépendantes cytosoliques?
- L'une de ces déshydrogénases à NADP aurait elle un rôle plus important que les autres en réponse à l'ozone ?
- Quels sont les mécanismes post-traductionnels de régulation de la PEPC sous ozone qui interviennent dans l'augmentation de son activité ?

Pour répondre à ces questions, le peuplier et l'arabette (*Arabidopsis thaliana*) ont été choisis comme matériels d'étude. Le peuplier (*Populus* spp.) est une espèce de grande importance économique, à croissance rapide et qui avec l'obtention d'hybrides a permis d'obtenir de nombreux génotypes, matériel de choix pour une stratégie d'adaptation à des contraintes biotiques et abiotiques. Ainsi, nous avons sélectionné plusieurs génotypes de peuplier euraméricains (*Populus deltoides* x *Populus nigra*) présentant une plus ou moins grande sensibilité à l'ozone. *Arabidopsis thaliana*, dont le génome est disponible depuis plusieurs années, est une plante modèle utilisée en génétique, biologie moléculaire et physiologie végétale pour appréhender les mécanismes moléculaires qui régulent la croissance et le développement de la plante. La disponibilité d'un mutant déficient pour l'une des déshydrogénases à NADP (*icdh* ; collaboration avec l'équipe du Pr. Graham Noctor) a permis d'étudier l'importance de cette déshydrogénase dans la réponse de la plante à une exposition élevée en ozone.

2. *ÉTAT DE L'ART*

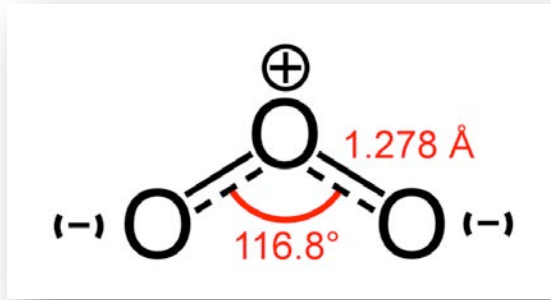


Figure 1. Représentation schématique d'une molécule d'ozone.

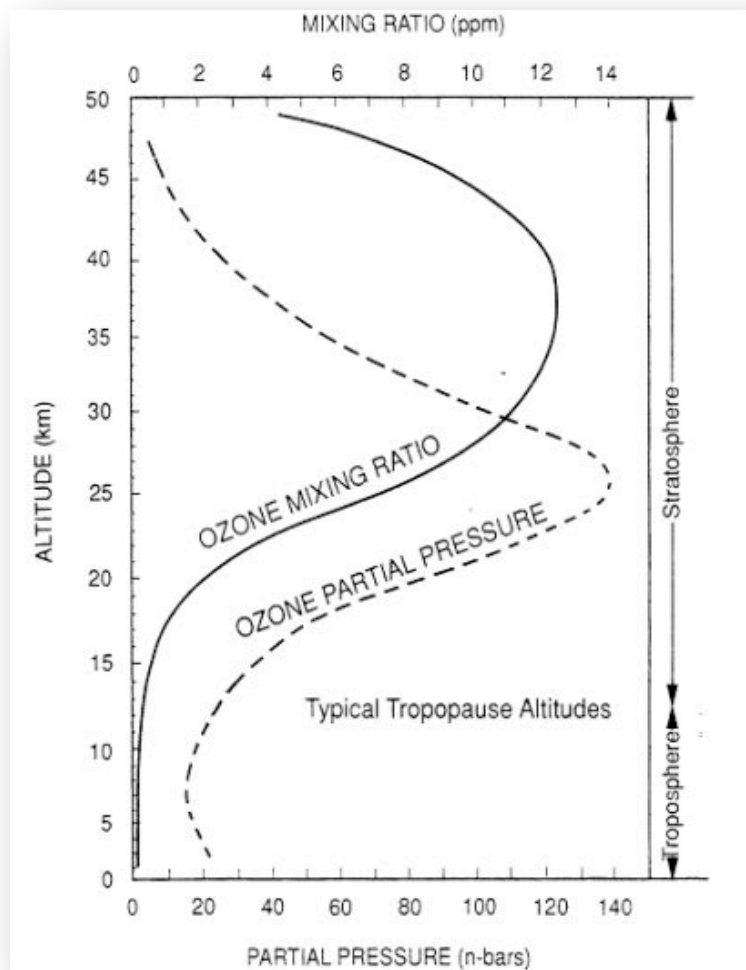


Figure 2. Distribution des concentrations en ozone dans l'atmosphère terrestre.

Source : Formations NRCCoTO, Measurement. 1991. Rethinking the ozone problem in urban and regional air pollution : National Academies Press.

2.1. GÉNÉRALITÉS SUR L'OZONE

L'ozone (O_3) a été découvert au XVIII^{ème} siècle (1789) par un chimiste allemand Martin van Marum après qu'il eut senti l'odeur piquante et caractéristique du produit de l'oxygène soumis aux éclairs d'un générateur électrique. Au milieu du XIX^{ème} siècle (1840), il a été reconnu comme composé chimique propre par le chimiste allemand Christian Friedrich Schönbein. En 1865, le chimiste français Jacques-Louis Soret propose la formule triatomique formée d'oxygène (O_3) confirmée ensuite par Schönbein peu avant sa mort (Rubin, 2001). Ces trois atomes d'oxygène sont disposés spatialement de manière à former un triangle isocèle de 1,278 Å formant un angle de 116,8° (Fig. 1). À température ambiante, l' O_3 est un gaz incolore très électrophile avec un potentiel d'oxydo-réduction de 2,076 V. Au contact d'un milieu aqueux, l' O_3 possède une demi-vie très courte et se décompose rapidement pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS), radical hydroxyle (HO^\bullet), ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), radical hydroperoxyde (HO_2^\bullet) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sont très réactifs (Von Gunten, 2007). Les propriétés oxydantes, électrophiles et nucléophiles font de l' O_3 une molécule à pouvoir désinfectant très efficace contre les bactéries et autres micro-organismes. Depuis plus d'un siècle, ces propriétés sont utilisées industriellement dans la désinfection de l'eau potable et le traitement des eaux usées, la désodorisation, et également pour tester la solidité de matières plastiques et d'alliages (Kim *et al.*, 2003). L'une des propriétés parmi les plus importantes, à l'échelle du globe terrestre, est la capacité de l' O_3 à absorber la lumière. L'atmosphère est conventionnellement divisée en deux niveaux de bases définis par la distribution de l' O_3 , la stratosphère et la troposphère (Fig. 2). Communément appelée couche d' O_3 , la stratosphère est localisée entre 20 et 30 km d'altitude et concentre 90% de l' O_3 atmosphérique formé naturellement par photolyse du dioxygène (O_2); le rayonnement solaire ultraviolet en décomposant l' O_2 produit deux atomes d'oxygène (O) extrêmement actifs, qui réagissent ensuite avec l' O_2 pour former l' O_3 . L'ozone absorbe les rayons UV-B ($\lambda < 200$ et 320 nm), permettant de filtrer la gamme la plus nocive (Hollósy, 2002). Cette protection naturelle, formée il y a 600 à 2000 millions d'années, a permis l'évolution de la vie sur terre en protégeant la biosphère des radiations néfastes du soleil. Ce bouclier est actuellement en grand danger, car les composés issus de l'activité humaine comme les composés halogénés contenant du chlore, du fluor, de l'iode ou du brome détruisent la couche d' O_3 . Les travaux de Molina et Rowland, au cours des années 70 (prix Nobel de chimie en 1995), sont les premiers à mettre en lumière une hausse considérable des émissions anthropiques de composés halogénés, dont les chlorofluorocarbones (CFC), qui, avec les oxydes d'azotes (NO_x), perturbent la dynamique délicate de la formation et de la destruction naturelles de l' O_3 dans la stratosphère (Bianco & Hynes, 2006). La troposphère possède une épaisseur variable (entre 7 et 16 km) suivant l'emplacement sur le globe. Cette couche ne contient que 10 % de l' O_3 atmosphérique (Fig. 2).

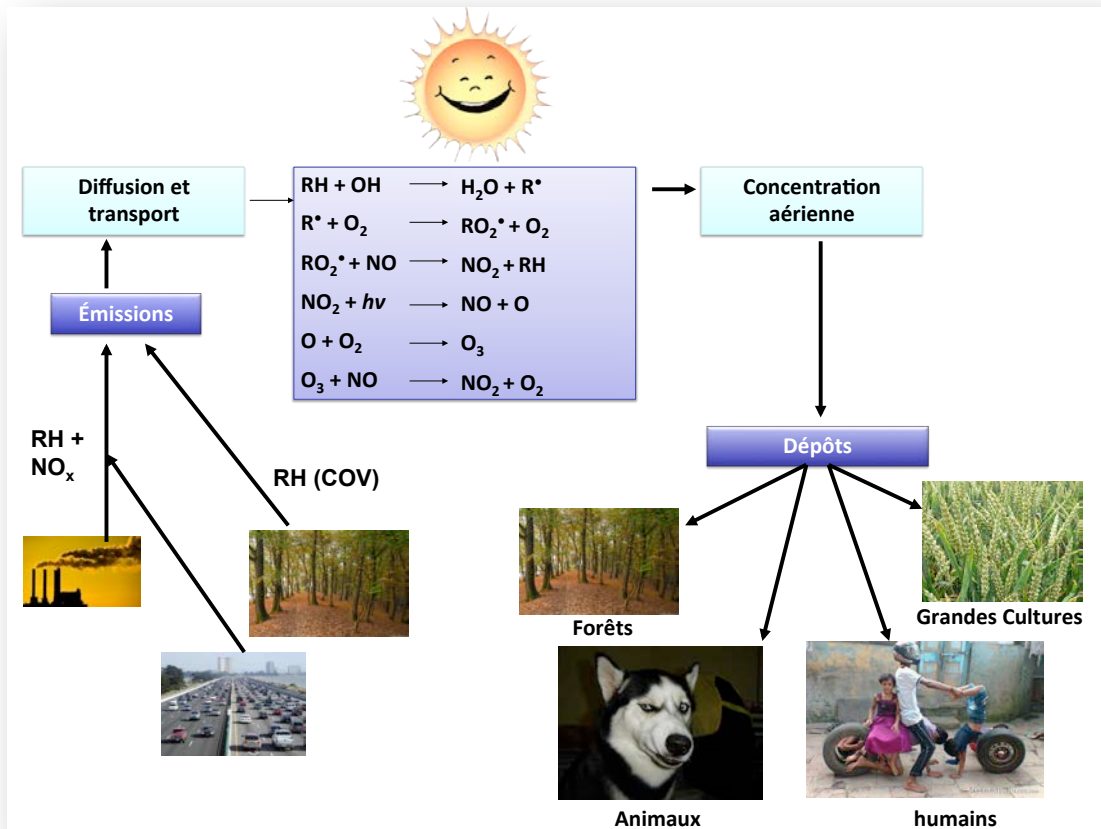


Figure 3. Cycle de l'ozone troposphérique depuis sa formation jusqu'à son dépôt.

Inspirée de : Formations NRCCoTO, Measurement. 1991. National Academies Press.

Comme les échanges verticaux entre stratosphère et troposphère sont très limités, la formation dans la troposphère de l'O₃ se réalise de la même manière que dans la stratosphère après dissociation de l'O₂ sous l'effet des UVs solaires. L'O₃ troposphérique absorbe le rayonnement infrarouge et constitue de ce fait un gaz à effet de serre contribuant de manière importante au forçage radiatif (IPCC, 2001).

Contrairement à la teneur élevée des gaz de l'atmosphère comme l'O₂ ou l'azote (N), la concentration en O₃ est faible et ne dépasse pas 0,07 ppb (parties par millions en volume). Dans la troposphère, la formation d'O₃ peut également faire intervenir la présence de composés organiques VOCs et des NO_x issus de la décomposition de la matière organiques terrestre (Lee *et al.*, 2002; Lee & Wang, 2006). Le boom industriel et économique qui a entraîné l'augmentation des transports terrestres utilisant des combustibles fossiles a favorisé la formation de VOCs et de NO_x. Ces derniers, sous l'effet du rayonnement UV, peuvent libérer un atome d'oxygène, qui en s'associant avec du O₂, donne du O₃ (Fig. 3). L'ozone formé peut réagir avec les monoxydes d'azote NO_x atmosphériques, ce qui limite son accumulation (Jenkin & Clemitshaw, 2000). La présence de VOCs dans la troposphère qui réagissent avec les NO_x, limite cette réaction des NO_x avec l'ozone, contribuant à l'accumulation d'ozone.

2.2. Évolution des concentrations d'ozone dans la troposphère

A l'heure actuelle, plusieurs études montrent que les concentrations atmosphériques de base d'O₃ ([O₃]) ont déjà atteint des niveaux néfastes pour la végétation terrestre (Akimoto, 2003; Karnosky *et al.*, 2007; Matyssek *et al.*, 2012). En Europe, une étude à basse altitude basée sur des enregistrements continus pendant 34-années, montre que les niveaux de base à la fin du XIX^{ème} siècle fluctuaient autour de 10 ppb (Volz & Kley, 1988). Toutefois, en dépit des législations et des efforts en matière de rejets de polluants, les concentrations de base ([O₃]) atmosphériques en O₃ ont augmenté considérablement ; elles auraient doublé depuis le début de l'ère industrielle atteignant 20 à 45 ppb (Vingarzan, 2004; Fuhrer, 2009).

Toutefois, les [O₃] troposphériques sont à la fois temporellement et spatialement hétérogènes. En effet, elles sont fonction des distances parcourues par les précurseurs depuis leurs sources de production, de l'heure de la journée et de la date dans l'année. Les concentrations sont souvent plus élevées dans les zones rurales que dans les zones urbaines. Ceci est généralement due au transport des polluants loin de leur site de production par l'action de phénomènes météorologiques (Oltmans *et al.*, 2006; Lefohn *et al.*, 2010). Tous ces paramètres compliquent bien évidemment l'étude des prévisions régionales saisonnières ainsi que les projections futures. D'une manière générale, des pics sévères sont détectés en été dans les régions industrielles en milieu d'après-midi (Thompson, 1992). Les teneurs actuelles mesurées à des altitudes moyennes dans l'hémisphère Nord sont comprises entre 20 et 65 ppb, avec une moyenne d'environ 40 ppb (Oltmans *et al.*, 2006; Helmig *et al.*, 2007).

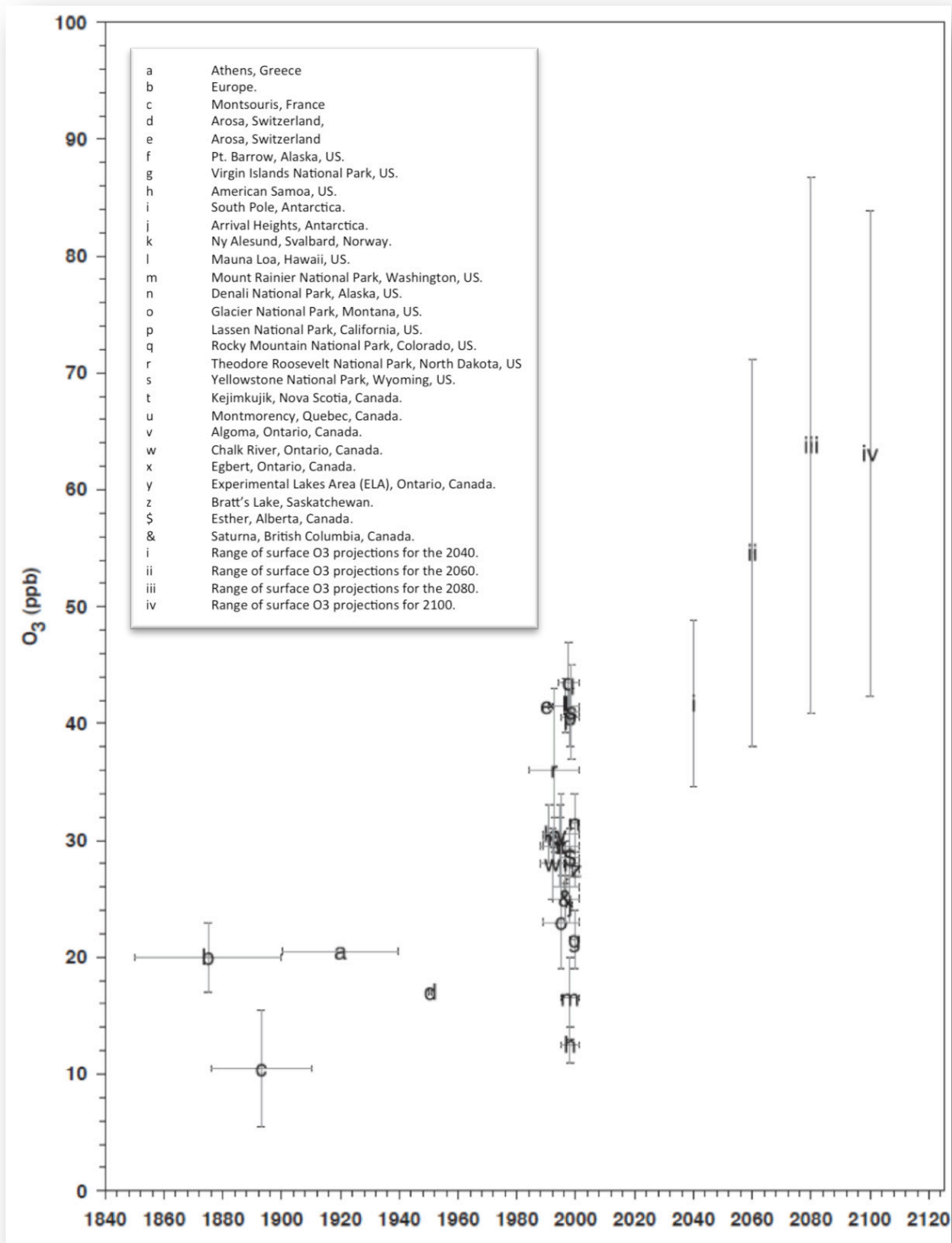


Figure 4. Historique et prévision des concentrations troposphériques en ozone de 1840 à 2100.

Valeurs historiques (a, b, c, d), mesures récentes (e à &) et projections du GIEC (i, ii, iii, iv). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-type indiqués dans les publications sources.

Source : Vingarzan, (2004)

Dans une étude pionnière à l'échelle du globe, le troisième rapport d'évaluation (TAR) de l'initiative PFCC (*Projections of Future Changes in Climate*), prévoit, sur la base du scénario le moins optimiste A2 du Rapport SRES (*Special Report on Emission Scenarios*), une augmentation significative des moyennes des [O₃] pour atteindre environ 68 ppb en 2050, et plus de 85 ppb d'ici 2100 (Ehhalt *et al.*, 2001). Plus récemment, dans son étude sur les prévisions des doses futures d'O₃, Vingarzan (2004) prévoit une moyenne troposphérique entre 35 et 48 ppb en 2040, et entre 42 et 84 ppb pour 2100 (Fig. 4). En matière de tendance, les régions se trouvant dans l'hémisphère Nord seront les plus touchées en raison des concentrations croissantes de précurseurs d'O₃ provenant toujours de l'activité industrielle qui est en continuel développement (Karnosky *et al.*, 2005). Même si elles restent spéculatives, ces prédictions témoignent de l'importance de la menace que représente les [O₃] troposphériques pour les écosystèmes forestiers et la végétation en général dans un futur proche.

2.3. Évolution des indices et seuils critiques d'exposition à l'ozone chez les végétaux

Les effets négatifs de l'O₃ peuvent varier en fonction de l'espèce (Baumgarten *et al.*, 2000; Matyssek *et al.*, 2004), des régions et des conditions de croissance (Wieser *et al.*, 2003), de la structure des peuplements et de l'âge des plantes (Matyssek *et al.*, 2004), mais aussi en fonction de la présence d'autres polluants (Karnosky *et al.*, 2005; Nunn *et al.*, 2005). Cependant, la relation entre la concentration ou dose d'O₃ et l'étendue des dégâts préjudice dû au stress n'est pas encore bien établie. Pour les peuplements forestiers, les effets d'une exposition aiguë ou chronique à l'O₃ sont insuffisamment étudiés.

Les seuils fondés sur des approches empiriques ne sont pas toujours validés (Baumgarten *et al.*, 2009). Au cours des 15 dernières années, la communauté européenne a cherché à définir les seuils critiques au-delà desquels des effets significatifs sur les espèces sensibles peuvent être attendus. Différentes méthodes ont été développées. Des indices basés sur l'évaluation, pendant une période de temps donnée, de la somme des concentrations d'O₃ au-delà d'un certain niveau défini ont été couramment utilisés en Europe. Le SUM (*sum of all hourly average concentrations over X ppm*) correspond à la somme des moyennes horaires de concentration en O₃ dépassant un seuil donné X. Dans les travaux employant ce concept, un seuil de 0,04 ppm était le plus communément utilisé. Dans le milieu des années 90, le concept de «niveau critique» a été introduit et validé par la Commission Economique pour l'Europe (UNECE, *United Nations Economic Commission for Europe*), aboutissant à l'élaboration de l'approche « AOT40 » calculée en sommant les différences entre les moyennes horaires, en plein jour, des concentrations en O₃ et une valeur fixe de 40 ppb (Fuhrer *et al.*, 1997). Cette approche permet d'éliminer les concentrations horaires en O₃ trop faible pour induire des dommages physiologiques.

Table 1. Effet de l’ozone sur plusieurs espèces végétales sur la base de niveaux critiques de flux d’ozone entrant.

Un modèle de flux (POD_Y) a été paramétré pour chaque espèce.

Source : Harmens *et al.*, (2010)

| Receptor | Effect (% reduction) | Parameter* | Critical level ($mmol\ m^{-2}$) |
|--|-------------------------|------------|--------------------------------------|
| Wheat | Grain yield (5%) | POD_6 | 1 |
| Wheat | 1000 grain weight (5%) | POD_6 | 2 |
| Wheat | Protein yield (5%) | POD_6 | 2 |
| Potato | Tuber yield (5%) | POD_6 | 5 |
| Tomato | Fruit yield (5%) | POD_6 | 2 |
| Norway spruce | Biomass (2%) | POD_1 | 8 |
| Birch and beech | Biomass (4%) | POD_1 | 4 |
| Productive grasslands (clover) | Biomass (10%) | POD_1 | 2 |
| Conservation grasslands (clover) | Biomass (10%) | POD_1 | 2 |
| Conservation grasslands (<i>Viola spp</i>), provisional | Biomass (15%) | POD_1 | 6 |

* POD_Y = Phytotoxic Ozone Dose above a threshold Y

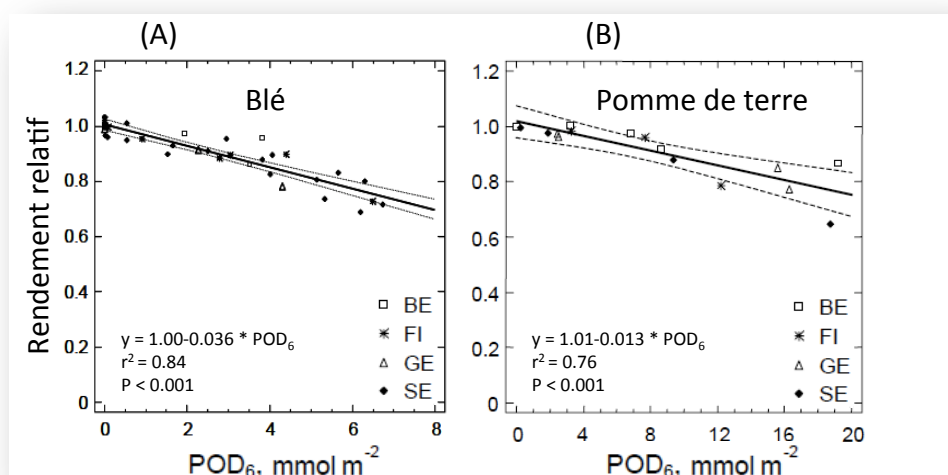


Figure 5. Relation entre le rendement relatif du blé (A) et de la pomme de terre (B) et la dose cumulée d’ozone décrit par l’indice POD_6 .

Relations établies à partir de 13 expériences sur 4 sites européens (BE Belgique, FI Finlande, IT Italie, SE Suède) pour le blé et 8 expériences sur 4 sites (BE Belgique, FI Finlande, GE Allemagne, SE Suède) pour la pomme de terre. Les lignes discontinues représentent un intervalle de confiance de 95%.

D’après : Harmens *et al.* (2010)

Ainsi des niveaux critiques d'O₃ susceptibles de réduire la biomasse de 5 à 10% selon les espèces ont été définis pour la végétation en Europe (Karlsson *et al.*, 2004; Paoletti & Manning, 2007). Par exemple, un niveau critique d'AOT40 de 5 ppm.h pour une période de croissance de 6 mois a été établi pour les arbres forestiers, le dépassement de ce seuil provoque des réductions de biomasse de plus de 5% par saison de croissance (Karlsson *et al.*, 2004). Pour les céréales, l'AOT40 défini sur une période de croissance de 3 mois est de 3 ppm.h⁻¹. Au-delà de cet indice, les dommages peuvent entraîner la perte de 10% de biomasse. Toutefois, cet indice n'accorde pas d'importance aux effets nocturnes de l'O₃ qui peuvent être significatifs chez quelques espèces sensibles. D'autres paramètres limitants comme le nombre faible d'expérimentations et d'espèces pris en compte ainsi que la grande variabilité des données remettent sérieusement en question la justesse et la pertinence d'un tel indice (Oksanen & Holopainen, 2001).

Compte tenu de ces limites, des concepts d'indices d'exposition basés sur le flux d'O₃ entrant dans les tissus foliaires ont vu le jour (Matyssek *et al.*, 2007). Ces indices, traduisent la dose d'O₃ cumulée, sur un laps de temps donné (CUO, *Cumulative Uptake of Ozone*) (Musselman *et al.*, 2006). Récemment l'indice CUO a été révisé, pour la dénomination de dose phytotoxique d'O₃ (POD, *Phytotoxic Ozone Dose*). A cet indice peut être ajouté une valeur de seuil de flux instantané Y en nmol.m⁻².s⁻¹ (Harmens *et al.*, 2010) permettant de définir une relation dose/effet plus réaliste d'un point de vue biologique (POD_Y). Il intègre l'effet du climat (température, humidité, lumière), les caractéristiques du sol (disponibilité de l'eau), le stade de développement de la plante et l'O₃ dans la fonction stomatique (Harmens *et al.*, 2010). En effet, dans un environnement d'expérimentation confinée ou sur le terrain, la détermination de l'indice de flux stomatique d'O₃ passe par la mesure de la conductance stomatique pour la vapeur d'eau. Comme la mesure en continu reste contraignante, on utilise souvent des modèles qui prédisent la valeur de la conductance (Emberson *et al.*, 2000; Karlsson *et al.*, 2004) en intégrant des paramètres spécifiques de l'espèce tels que la conductance stomatique maximale et minimale (mesurées à lumière saturante), et les variables physiques du terrain tel que le déficit de pression de vapeur d'eau, l'intensité lumineuse, et la température. Les relations dose/effet pour des plantes de grande culture comme le blé et la pomme de terre et des arbres forestiers (tableau. 1) (Harmens *et al.*, 2010) ont permis d'élaborer des seuils critiques d'exposition à l'O₃ sous la forme d'une dose cumulée susceptible de réduire la biomasse d'une manière significative (graines ou fruits) (Fig. 5). Pour le blé et la pomme de terre, les niveaux critiques annuels correspondent à une POD₆ de respectivement 1 et 5 mmol.m⁻² (Pleijel *et al.*, 2007). L'épicéa norvégien possède une POD₁ qui augmente le seuil critique à 8 mmol.m⁻² et qui peut engendrer des pertes en biomasse annuelle allant jusqu'à 2% (Karlsson *et al.*, 2007).

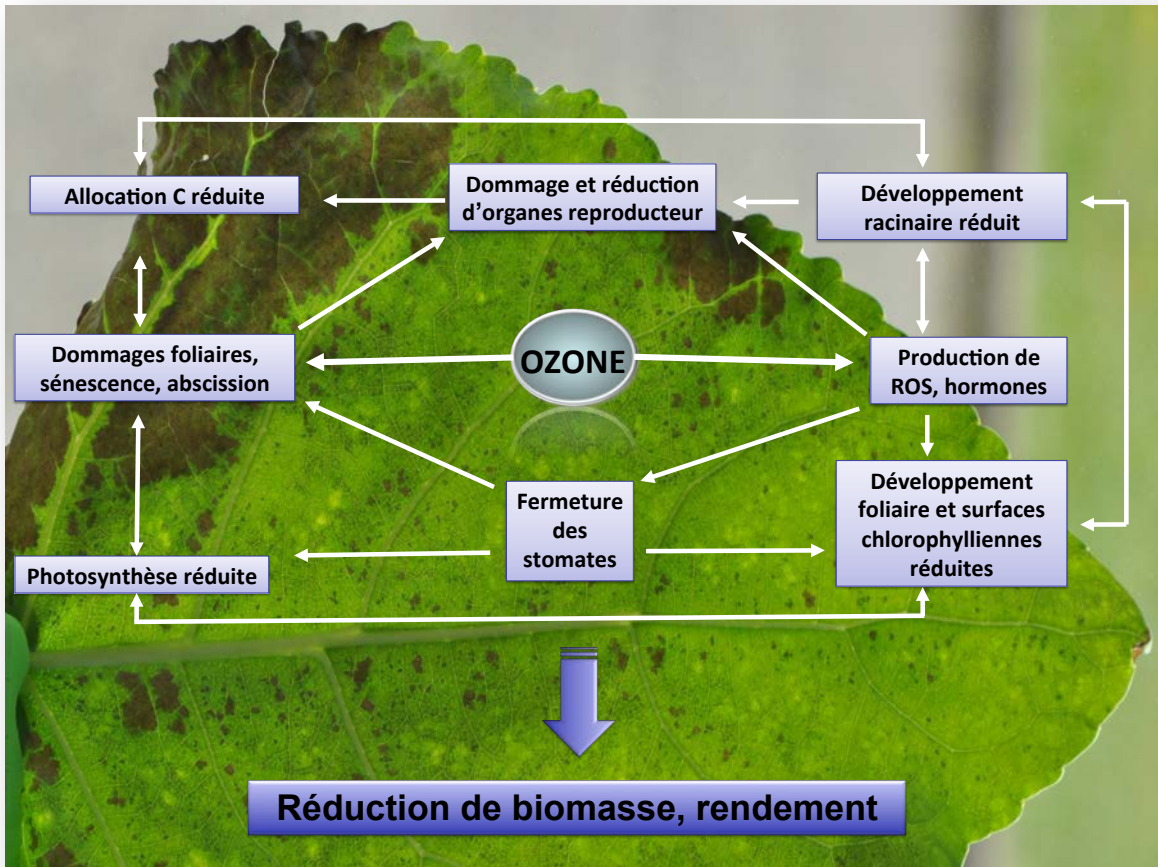


Figure 6. Effets de l'ozone sur un ensemble de processus physiologiques et son impact sur la végétation.

2.4. Impact de l'ozone sur la végétation

Depuis la découverte de l'effet négatif de l'O₃ sur les plantes, au milieu du XIX^{ème} siècle en Californie (Haagen-Smit *et al.*, 1952), les scientifiques se sont intéressés à l'étude des processus intervenant dans la réponse à l'O₃, notamment concernant la sensibilité ou la tolérance des espèces. D'un point de vue historique, l'O₃ est un stress relativement récent pour la végétation et le développement de dommages sur la végétation incite la communauté scientifique à développer les recherches concernant ses effets. Dans cette partie, nous allons prendre en compte l'effet de l'ozone sur plusieurs processus physiologiques, souvent interconnectés, qui entraînent une réduction de biomasse significative chez les espèces cultivées (Fig. 6) ou chez les arbres forestiers. L'apparition de symptômes foliaires est souvent une étape caractéristique de la toxicité de l'O₃. Ces symptômes peuvent varier suivant l'espèce végétale en question, mais ils se matérialisent souvent en tâches chlorotiques ou nécrotiques, ainsi qu'en marbrures rougeâtres (Gravano *et al.*, 2004). À l'intérieur des feuilles, l'O₃ interagit avec le milieu apoplasmique et les membranes cellulaires adjacentes aux parois végétales, pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (Fiscus *et al.*, 2005). Ceci induit une cascade de réactions en chaîne qui se transmet aux cellules adjacentes. Les ROS non neutralisés par les systèmes chélateurs extra- et intracellulaires peuvent directement ou indirectement causer différents types de lésions foliaires telles que des nécroses qui induisent, généralement, la sénescence et la chute précoce de la feuille. Ces symptômes ont été signalés pour 27 espèces naturelles et de grande culture à travers toute l'Europe (Mills *et al.*, 2011) et pour de nombreuses espèces d'arbres (Felzer *et al.*, 2007). Même s'ils ne se produisent qu'au début du cycle végétatif des espèces de grande culture, les symptômes dus à l'O₃ peuvent réduire la productivité d'une manière significative. Les lésions foliaires, la sénescence, et/ou l'abscission peuvent réduire directement les rendements de biomasse dans les cultures de luzerne, laitue, épinards, chicorée, et chou [revue dans Wilkinson *et al.* (2012)]. Chez des céréales et des graminées, ces symptômes réduisent les surfaces des feuilles saines (vertes) indispensables pour la fixation du carbone, et limitent donc la croissance et/ou le remplissage des grains (Mulholland *et al.*, 1998; McKee & Long, 2001). Une corrélation entre symptômes foliaires et réduction de croissance a été mise en évidence pour quelques espèces d'arbres comme le pin blanc. Une étude comparative de Reich (1987) a évalué la réduction de croissance allant jusqu'à 3% pour des conifères, 13% pour des espèces caducifoliées et 36% pour diverses autres espèces cultivées sous une dose cumulée d'O₃ de 20 ppm.h⁻¹. Toutefois, une exposition chronique à l'O₃ peut affecter la physiologie et la croissance des arbres sans apparition nette de dommages visibles (Heath *et al.*, 2009). Dans un scénario de pollution à l'O₃, un des événements qui peut affecter la fixation du CO₂, et donc la photosynthèse, est la fermeture des stomates (Torsethaugen *et al.*, 1999; McAinsh *et al.*, 2002; Overmyer *et al.*, 2008).

Cette fermeture stomatique est supposée être le premier mécanisme de protection visant à limiter la dose d'O₃ délivrée dans l'espace intercellulaire. Les différences intraspécifiques de sensibilité à l'O₃ chez le blé et le peuplier ont été liées à des différences de conductance (Guidi *et al.*, 2001; Degl'Innocenti *et al.*, 2003). Les modifications de l'activité photosynthétique des cellules de garde, la signalisation à l'acide abscissique (ABA) et/ou éthylène (ET) -dépendante, ou la génération excessive de ROS directement dans les cellules de garde sont autant de mécanismes modifiant la conductance stomatique [revue dans Kangasjärvi *et al.* (2005); Wilkinson *et al.*, (2012)].

La restriction de la photosynthèse dans les parties aériennes de la plante réduit considérablement les niveaux des glucides disponibles pour les autres organes-puits de la plante comme les racines, les organes reproducteurs et les méristèmes végétatifs (Wilkinson *et al.*, 2012). Ainsi, sous O₃, privés de sources de carbone, les organes-puits souffrent de déficit de croissance. Un effet négatif direct de l'O₃ a été montré chez le coton et le blé, où l'O₃ inhibe l'allocation du carbone par l'intermédiaire d'un stress oxydatif qui touche les transporteurs membranaires, provoquant ainsi une inhibition de la fonction de charge du phloème (McKee & Long, 2001; Grantz, 2003). Une étude répertoriant 8 espèces d'arbres forestiers indique une réduction moyenne de 24 % du coefficient allométrique de répartition de la biomasse entre parties racinaires et aériennes (Grantz *et al.*, 2006). Il a été proposé que l'O₃ puisse réduire la biomasse racinaire par l'intermédiaire de l'ET (Wilkinson & Davies, 2010), qui a un effet négatif sur la croissance racinaire chez les plantes dans des conditions contrôles.

Peu d'études se sont intéressées à la part des dommages causés directement par l'O₃ sur la reproduction, tels que l'effet sur l'initiation florale, sur le développement des ovaires et du pollen, et sur la maturation des graines. Davison & Barnes (1998) ont observé des effets contrastés sur l'allocation des ressources vers les organes reproducteurs et les autres parties végétatives chez différentes espèces à la suite d'une exposition journalière de 70 ppb d'O₃. L'allocation vers les organes reproducteurs a été réduite chez *Chenopodium album* et *Matricaria discoidea*, mais a augmenté chez *Papaver dubium* et *Trifolium arvense*. Okano *et al.* (1984) ont montré qu'après l'exposition à l'O₃ de *Phaseolus vulgaris*, la plante dirige une plus grande proportion d'assimilats vers les jeunes feuilles en cours de développement au détriment des racines. L'ozone peut avoir un effet directement sur l'appareil reproducteur, les surfaces des stigmates, le pollen, les anthères, les sites floraux, et jusque sur les graines et les fruits entiers (Black *et al.*, 2000). Comme dans les feuilles, l'entrée de l'O₃ dans l'espace apoplasmique des cellules qui constitue les structures reproductives, entraîne la génération de ROS conduisant à des dommages dans les membranes cellulaires (Feder & Shrier, 1990).

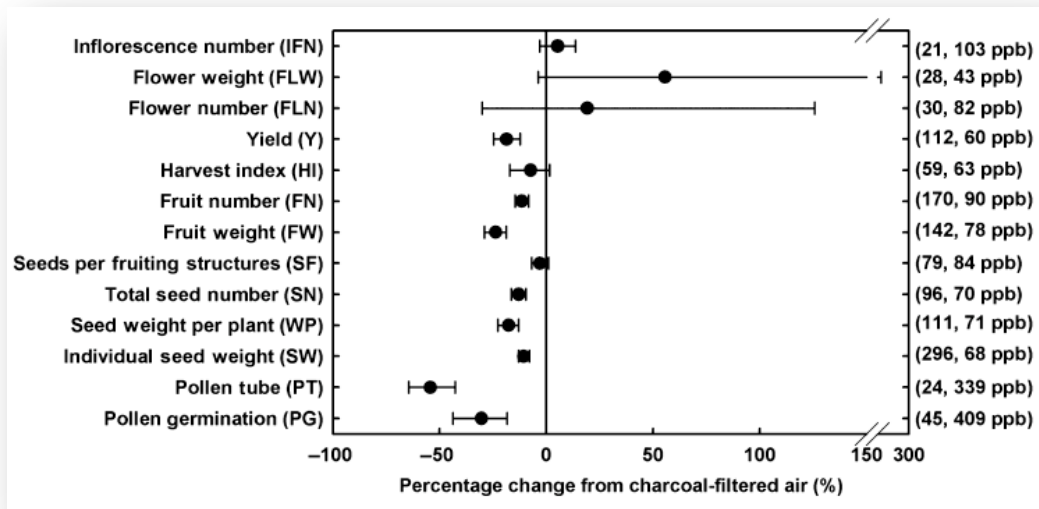


Figure 7. Effet de l’ozone sur la croissance d’organes reproducteurs.

Les barres représentent les intervalles de confiance de 95%. Les valeurs entre parenthèses représentent les concentrations moyennes d'ozone pour chaque paramètre.

Source : **Leisner & Ainsworth** (2011)

Les ROS produites à la suite d'un stress O₃ peuvent également affecter la capacité du pollen à pénétrer la surface des stigmates (Hormaza & Herrero, 1996). Ainsi, elles peuvent modifier le potentiel redox des cellules qui entourent cellulaire environnant le pollen et conduire donc à des changements dans la croissance et l'orientation du tube pollinique, étapes critiques pour la fécondation de l'embryon. Tous ces effets, induits par l'O₃, affectent le développement et la croissance de l'appareil reproductif et peuvent ainsi affecter le développement et la viabilité des graines (Ainsworth *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008; Wittig *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2010). Une étude méta-analytique réalisée par Eisner & Ainsworth (2011), résumant plus de 128 articles scientifiques qui traitent de l'effet de la dose d'O₃ sur la reproduction et le développement, montre que les [O₃] ambiantes actuelles peuvent réduire de 16% le rendement en graines, de 9% et 22% le nombre et la masse des fruits (Fig. 7).

2.5. Les mécanismes d'action de l'ozone à l'échelle cellulaire

2.1.1 Entrée de l'ozone dans les feuilles

Comme l'entrée de l'O₃ à travers la cuticule des feuilles est négligeable (Kerstiens & Lenzian, 1989), le flux d'O₃ dans l'apoplasme est largement contrôlé par le flux des échanges gazeux au niveau des stomates (Castagna & Ranieri, 2009). Cette vitesse est fonction de nombreux paramètres comme le nombre de stomates, leur dimension et leur degré d'ouverture. En présence d'O₃, la fermeture des stomates est fréquemment observée chez les espèces herbacées et chez les arbres. Par exemple, une diminution très marquée de la conductance stomatique a été observée chez certaines espèces de peupliers et d'*Arabidopsis* (Bagard *et al.*, 2008; Brosché *et al.*, 2010), ce qui suggère une réaction foliaire rapide à la contrainte, destinée à lutter contre l'entrée du polluant (Castagna *et al.*, 2001). Ceci a été démontré dans le travail de Degl'Innocenti *et al.* (2003) où la fermeture induite suite à une exposition aiguë de 3h de 150 ppb d'O₃, ne peut être observée que chez le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) considéré comme résistant, alors que cette dose d'O₃ n'a eu aucun effet sur le trèfle rouge (*Trifolium pratense*) considéré comme une espèce sensible. Un comportement similaire a également été observé pour deux clones de peuplier connus pour leurs différences de sensibilité à l'O₃ en termes de développement et de dommages foliaires : le clone sensible *Eridano* (*Populus deltoides* x *maximowiczii*), et le clone résistant I-214 (*Populus euramericana*). Après une fumigation chronique d'O₃ de 60 ppb pendant 7 jours, I-214 a diminué significativement sa conductance stomatique au cours de la période de traitement, alors que *Eridano* n'a pas mis en place un tel mécanisme (Guidi *et al.*, 2001). Toutefois, les deux clones procèdent à la fermeture stomatique au cours d'une exposition aiguë à l'O₃ (Nali *et al.*, 1998).

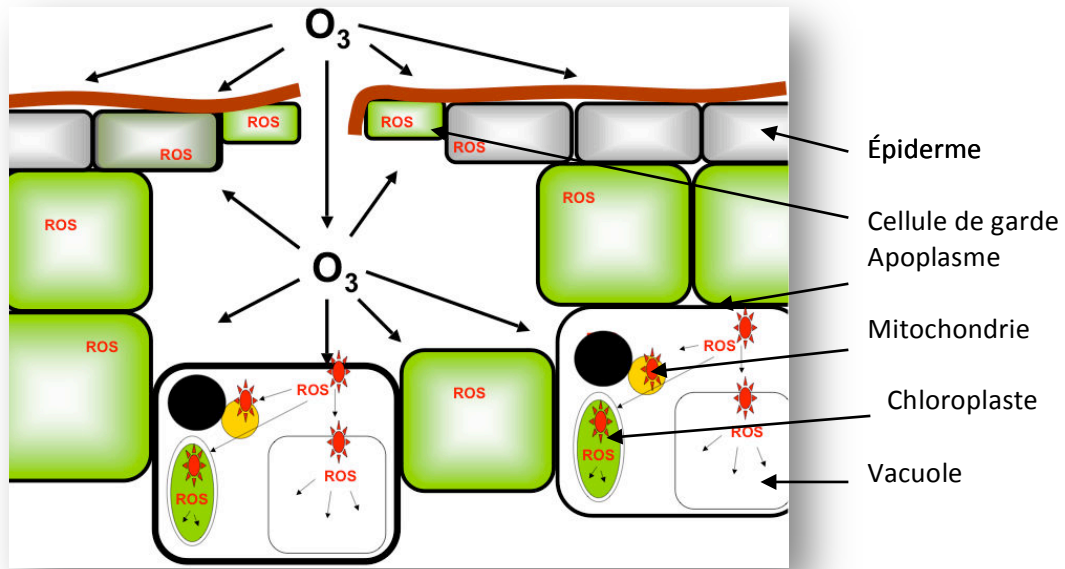


Figure 8. Pénétration de l'ozone atmosphérique dans la chambre sous- stomatique et sa transformation en ROS.

Dans ce cas, les différences de tolérance observées ne peuvent pas être attribuées seulement à l'évolution de la réponse stomatique, mais tiennent compte aussi des mécanismes de protection et de réparation intracellulaire.

2.1.2 Production de ROS

L'ozone est pratiquement indétectable dans l'apoplasme. Immédiatement après son entrée dans la chambre sous-stomatique et au contact avec un certain nombre de composés de la paroi cellulaire, il se décompose spontanément pour donner des ROS (Fig. 8). Parmi ces ROS, on peut trouver le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) (Laisk *et al.*, 1989; Langebartels *et al.*, 2002). Le $O_2^{\bullet-}$ comme le H_2O_2 s'accumulent dans les feuilles du trèfle sensible (blanc) après une exposition à l' O_3 (150 ppb, 3 h), tandis que le trèfle asymptotique (rouge) n'accumule que du H_2O_2 (Scebba *et al.*, 2003). Pareillement, dans les feuilles de peuplier du clone sensible Eridano, la localisation cytochimique de l' H_2O_2 *via* coloration au $CeCl_3$, révèle que l'accumulation extracellulaire de cette ROS est l'une des premières réponses détectables à l'exposition (1 h, 150 ppb) (Diara *et al.*, 2005). Les sites d'accumulation de l' H_2O_2 ont été corrélés à l'apparition de lésions sur les feuilles (Pellinen *et al.*, 1999; Wohlgenuth *et al.*, 2002). Une faible accumulation d' H_2O_2 chez le Peuplier I-214 pourrait expliquer l'absence de lésion foliaire (Diara *et al.*, 2005). Il est important de signaler, comme rapporté par Levine *et al.* (1994), que les niveaux de H_2O_2 nécessaires pour induire la mort cellulaire sont généralement plus élevés que ceux capables d'induire l'activation des gènes de défense. Ranieri *et al.* (2003) ont effectué une étude approfondie sur la localisation et la production du H_2O_2 en temps réel chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.), à la suite d'une seule exposition de 150 ppb pendant 4 h. Le peroxyde d'hydrogène semble s'accumuler progressivement dans les parois cellulaires 30 min après le début de l'exposition, principalement dans les parenchymes lacuneux et palissadique. L'absence de lésions sur les feuilles d'*H. annuus* a été attribuée à l'absence d'une seconde libération d'éléments oxydant et de H_2O_2 propre à la cellule pendant la période qui suit la fumigation ou période de recouvrement (Ranieri *et al.*, 2003), contrairement à ce qui était montré chez d'autres espèces (Pellinen *et al.*, 1999).

En fait, les ROS non neutralisées agissent comme signal provoquant l'induction, propre à la cellule, de ROS supplémentaires. Cette auto-génération de ROS se poursuit après la fin de l'exposition à l' O_3 , donnant lieu à une deuxième décharge de radicaux libres. Par conséquent, une accumulation conséquente du H_2O_2 se met en place au niveau des parois cellulaires et des membranes plasmiques. Dans un deuxième temps, cette production se poursuit dans le cytoplasme, les peroxysomes et les mitochondries (Pellinen *et al.*, 1999). Il a été postulé par Levine *et al.* (1994) que cette deuxième génération de ROS est nécessaire pour l'induction de la mort cellulaire au cours de la réaction hypersensible (HR, *Hypersensitive Reaction*) chez les plantes.

Ceci a été démontré chez *Nicotiana tabacum* L. cv (Bel W₃) où le traitement à l'O₃ (150 ppb, 5 h) induit l'accumulation rapide d'H₂O₂, avec un premier pic transitoire accompagnant l'exposition, puis l'apparition d'un second pic plus élevé et plus persistant après le transfert des plantes à l'air libre (Pasqualini *et al.*, 2003). Le peroxyde d'hydrogène n'est pas réparti de manière homogène sur la surface de la feuille, mais concentré dans des zones séparées où des lésions nécrotiques se sont manifestées. Son accumulation s'est produite dans les deux parenchymes, dans la membrane plasmique des cellules épidermiques (Pasqualini *et al.*, 2002), et aussi dans les mitochondries (Ederli *et al.*, 2006). De plus, sa production s'accompagne d'une transcription momentanée du marqueur de réponse hypersensible (HR) telles que la protéine *PR1* (*PATHOGENESIS RELATED1*), de l'augmentation de l'activité protéase et de la condensation de la chromatine, indiquant que la mort cellulaire programmée (PCD, Programmed Cell Death) est imminente (Pasqualini *et al.*, 2003). Un grand nombre de processus à l'origine de la formation de ROS au cours d'un traitement à l'O₃ a été signalé. On peut citer l'implication, entre autres, des complexes NAD(P)H oxydases du plasmalemm (pour la génération d'ion superoxydes), des peroxydases (POD), des superoxydes dismutases (SOD) ainsi que des oxalate oxydases et des diamine et polyamine oxydases pour la génération d'H₂O₂ (Bolwell & Wojtaszek, 1997; Šebela *et al.*, 2001; Langebartels *et al.*, 2002). La capacité des POD pour générer de l'H₂O₂ dépend du pH du liquide extracellulaire, la production maximale se réalisant à pH neutre ou basique, selon l'isoforme étudiée (Bolwell & Wojtaszek, 1997). L'alcalinisation de l'apoplasme qui se produit lors de l'application d'un stress O₃ pourrait être d'une importance majeure dans le déclenchement de la production de l'H₂O₂ par les POD(s) cellulaires. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des NADPH-oxydases et des POD a pu mettre en lumière le rôle important de ces enzymes dans la production et l'accumulation de l'H₂O₂ dans les feuilles de tournesol exposées à l'O₃ (150 ppb, 4 h) (Ranieri *et al.*, 2003). L'accumulation du H₂O₂ est un événement complexe et hautement régulé qui nécessite l'intervention d'autres complexes enzymatiques. Ces derniers, mettent en action des complexes POD et / ou NAD(P)H oxydase qui sont pH dépendante et qui possèdent une nature et une localisation différentes que celles déjà citées. Ces grands complexes peuvent être libres ou liés d'une manière ionique ou covalente aux membranes cellulaires (Ranieri *et al.*, 2003). Étudiés chez deux génotypes différents de tomate (Castagna *et al.*, 2007) ou/et dans deux clones de peuplier (Diara *et al.*, 2005), des PODs pH-dépendantes semblent également avoir une contribution dans l'accumulation du H₂O₂.

2.1.3 Ozone et monoxyde d'azote

Un radical libre produit d'une manière transitoire à la suite d'une exposition à l'O₃ est le monoxyde d'azote (NO[•], Nitric Oxide) (Ederli *et al.*, 2006).

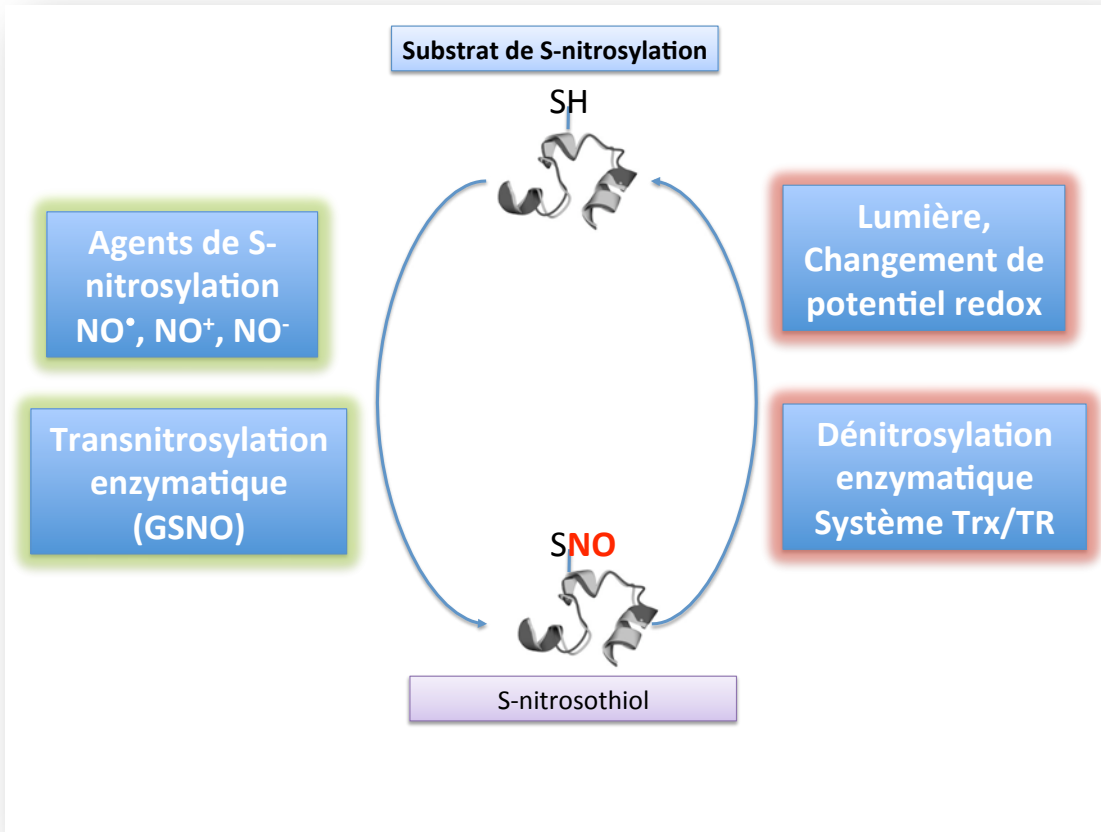


Figure 9. Principe de base de la S-nitrosylation.

La S-nitrosylation se réalise sur des résidus Cys spécifiques, provoquée par les espèces réactives de l'azote (RNS, *Reactive Nitrogen Species*), dont le NO•, NO⁺ et les NO_x (exemple le N₂O₃), et l'intervention d'agents S-nitrosylant, notamment le GSNO. Une fois formés, les S-nitrosothiols sont très sensibles aux changements de lumière et de potentiel d'oxydo-réduction. La dénitrosylation peut être par exemple catalysée par le système thiorédoxine / thiorédoxine réductase (Trx / TR).

D'après: Astier et al. (2011)

Dans une étude sur *Arabidopsis*, Ahlfors *et al.* (2009b) ont enregistré deux productions transitoires de NO qui se réalisent dans les feuilles de plantes soumises à une dose aiguë de 350 ppb pendant 6h. La première se produit 2 à 3 h après le début du traitement et induit la production d' H₂O₂. La deuxième, coïncide avec l'apparition des premières lésions (8h).

2.1.3.1 **Le monoxyde d'azote**

Le NO (NO[•], NO⁻ & NO⁺) est un gaz qui joue le rôle de médiateur physiologique universel dans le vivant (Astier *et al.*, 2011). Chez les plantes, le NO est impliqué dans de nombreux mécanismes de régulation liés au métabolisme (homéostasie du fer), au transport de fluide, à la floraison et à la signalisation (modulation des niveaux physiologiques de l'acide salicylique (SA) et de l'acide jasmonique (JA) et dans la synthèse d'éthylène) (Delledonne *et al.*, 1998; Delledonne *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; Parani *et al.*, 2004; Zeidler *et al.*, 2004; Delledonne, 2005; Ahlfors *et al.*, 2009a). Des études montrent également son implication dans la résistance aux pathogènes, dans la réponse aux stress abiotiques, plus généralement dans la détoxification cellulaire avec aussi son intervention dans la biosynthèse de la lignine (Parani *et al.*, 2004; Delledonne, 2005). Le NO est produit rapidement après une attaque pathogène, car il est impliqué dans la signalisation cellulaire au cours de la HR dans les plantes (Delledonne, 2005). Dans un même registre, Zago *et al.* (2006) ont montré que le NO couplé à l'H₂O₂ induisent la PCD. En outre, il a été suggéré que, chez les plantes, le NO peut agir en tant que molécule à potentiel antioxydant, en chélatant directement des ROS (Beligni & Lamattina, 1999). Le monoxyde d'azote induit efficacement des changements dans l'expression des gènes (Parani *et al.*, 2004; Grün *et al.*, 2006; Zago *et al.*, 2006), ce qui suggère un rôle indirect mais actif dans la modification des réponses des plantes au stress. Une caractéristique importante du NO est sa nature lipophile, facilitant sa diffusion à travers les membranes végétales et l'induction des modifications post-traductionnelles par S- ou métal nitrosylation des résidus cystéines (Cys) et nitration des résidus tyrosine (Tyr) (Astier *et al.*, 2011). Ces modifications de cibles spécifiques dans plusieurs voies métaboliques et dans plusieurs compartiments cellulaires (directement ou indirectement) modulent le développement et la réponse aux stress des plantes (Baudouin, 2011).

Chez les plantes, une augmentation des protéines nitrosylées, après l'application de donneur de NO ou de plusieurs stress, a été rapportée chez différentes espèces (Lindermayr *et al.*, 2011, Astier *et al.*, 2011). Dans la catégorie des modifications par nitrosylation, la S-nitrosylation est une réaction conduisant à une liaison covalente du groupement NO avec un ou plusieurs résidus cystéines de la protéine cible, qui mène à la formation du S-nitrosothiol (Hess *et al.*, 2005). Cette modification peut aboutir à l'activation ou à l'inhibition des protéines cibles et est considérée, au même titre que la phosphorylation, comme un mécanisme majeur de modification post-traductionnelle de protéines chez les plantes (Grennan, 2007; Baudouin, 2011).

2.1.3.2 Mécanismes de S-nitrosylation

Comme précisé dans le paragraphe précédent, la S-nitrosylation désigne la réaction du NO avec l'atome de soufre d'un résidu Cys pour former une liaison S-NO (Fig. 9). La S-nitrosylation peut faire intervenir une autre réaction préliminaire du NO[•] avec l'O₂ pour donner d'autres oxydes d'azote, notamment le N₂O₃, qui se dissocient pour donner NO⁺ ou NO⁻ (Astier *et al.*, 2011). Outre ces mécanismes chimiques, la transnitrosylation semble être un processus important pour expliquer la nitrosylation des résidus Cys (Fig. 9). La transnitrosylation consiste en l'échange direct de NO_x avec un groupement thiol réactif d'une protéine cible et implique des molécules à S-nitrosothiols de faibles poids moléculaires comme le (GSNO). Le nitrosogluthathione est formé principalement par S-nitrosylation du GSH (Glutathion réduit). De ce fait, dans une cellule végétale, le GSNO peut être considéré comme un réservoir endogène de NO (Wang *et al.*, 2004).

Des études biochimique et génétiques réalisées chez les animaux et les plantes ont conduit à l'identification de la formaldéhyde déshydrogénase GSH-dépendante, également nommée GSNO réductase (GSNOR), une enzyme clé dans le métabolisme du GSNO (Rustérucci *et al.*, 2007). L'activité de cette enzyme contrôle à la fois la disponibilité du NO et les niveaux de protéines intracellulaires S-nitrosylées, ce qui affecte le métabolisme et la résistance aux maladies (Liu *et al.*, 2004; Feechan *et al.*, 2005; Rustérucci *et al.*, 2007).

De point de vue structure, bien que plusieurs résidus Cys puissent exister dans une protéine, seuls certains d'entre eux peuvent être candidats à une S-nitrosylation (Belenghi *et al.*, 2007). Cette spécificité est régie par plusieurs facteurs. Tout d'abord, la formation de S-nitrosothiol peut être favorisée dans les résidus Cys les plus facilement ionisables, généralement entourés par des résidus à la fois acides et basiques. Partant de ce constat, Stamler *et al.* (1997) ont défini un motif consensus S-NO, (K,R,H,D,E)(C)(D,E) qui s'est avéré ensuite de faible intérêt en raison de la diversité des domaines qui entourent les résidus Cys. La présence, dans des compartiments hydrophobes, d'une protéine pourrait pousser les résidus Cys à la S-nitrosylation. Ce concept repose sur le fait que les noyaux hydrophobes d'une protéine peuvent concentrer le NO et l'O₂ et donc favoriser la réaction (Seth & Stamler, 2011).

Dernièrement, un logiciel de prédiction de sites de S-nitrosylation a été récemment mis au point et est disponible gratuitement en ligne (<http://sno.biocuckoo.org/online.php>) (Xue *et al.*, 2010). Les résultats de prédiction devraient être utiles et d'intérêt pour le dépistage et l'analyse de protéines potentiellement régulées par cette modification post-traductionnelle. Toutefois, la liaison S-NO est de faible énergie et elle s'avère très sensible à la lumière et au potentiel d'oxydo-réduction autour de la protéine (Fig. 9). Par conséquent, des agents réducteurs intracellulaires tels que les formes réduites du glutathion ou l'ascorbate (ASA) peuvent détruire ces liaisons et provoquer ainsi la dénitrosylation.

Chez les animaux, certains complexes enzymatiques jouent le rôle de dénitréosylases telles que la disulfure isomérase, la glutathion peroxydase [revue dans Benhar *et al.* (2009)]. L'exemple du système thiorédoxine / thiorédoxine réductase (Trx / TR) est particulièrement pertinent et sa présence a été récemment signalée chez les plantes, dans le cadre de la régulation, sous stress, des NPR-1 (Non-expressor of Pathogenesis-Related gene 1) chez *A. thaliana* (Després *et al.*, 2003).

2.1.3.3 Fonctions des protéines S-nitrosylées

Récemment, chez *Arabidopsis*, de nombreuses protéines S-nitrosylées ont été identifiées à partir d'extraits de culture de cellules traitées avec le donneur de NO, le GSNO (Lindermayr *et al.*, 2005; Lindermayr & Durner, 2009). L'identification des protéines potentiellement S-nitrosylées est le point de départ de la caractérisation biochimique et fonctionnelle de cette modification. Ainsi, l'implication de la S-nitrosylation dans la régulation d'enzymes clés intervenant dans différents processus physiologiques, tels que les réactions de biosynthèses protéiques, la réponse au stress biotique et abiotique, la synthèse d'antioxydant, l'activité protéolytique, la transcription, la photosynthèse, et des voies de phosphorespiration mitochondriale a été démontrée (Perazzoli *et al.*, 2004; Lindermayr *et al.*, 2006; Belenghi *et al.*, 2007; Romero-Puertas *et al.*, 2007; Tada *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Abat & Deswal, 2009; Palmieri *et al.*, 2010).

La réponse à l'O₃ et à d'autres types de stress passe par la production de ROS, en particulier le H₂O₂ intracellulaire qui module la destinée de la cellule. Dans la cellule les NADPH-oxydases ainsi que la voie de β-oxydation d'acides gras sont les principales voies de génération de l' H₂O₂. Ces deux voies sont activées par la S-nitrosylation (Wang *et al.*, 2010; Yun *et al.*, 2011). Au contraire, des enzymes connues pour leur rôle dans l'élimination de l' H₂O₂ sont réversiblement inhibées *in vitro* comme *in vivo* par des donneurs de NO. On peut citer la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX) la glutathion peroxydase (GPX) (Clark *et al.*, 2000; Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2011; Ortega-Galisteo *et al.*, 2012).

Il a été démontré que la S-nitrosylation inhibe aussi l'activité d'un membre de la famille des peroxyrédoxines IIE (PrxIIIE) (Romero-Puertas *et al.*, 2007). Située dans le chloroplaste, cette famille est capable d'éliminer l'H₂O₂ (Dietz, 2003). Les PrxIIIE possèdent également une activité réductase peroxy-nitrite. Le peroxy-nitrite, qui dérive du NO, est une espèce réactive azotée (RNS), très toxique et capable de peroxydation des lipides et de nitration des résidus tyrosine (Leterrier *et al.*, 2011). Toujours dans la réponse des plantes au stress, une cible intéressante, identifiée chez *Arabidopsis*, est la glutathion S-transférase (GST) (Lindermayr *et al.*, 2005). Chez le rat, les isoformes cytosoliques sont sujets à une inhibition après un traitement avec GSNO (Ji *et al.*, 2002). Une enzyme d'importance capitale dans cycle ascorbate-gluthathion chez les plantes est la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR), qui catalyse la réduction du radical monodéhydroascorbate (MDA) en ascorbate, en utilisant le NAD(P)H comme donneur

Table 2. Sélection de protéines S-nitrosylées citées dans la littérature dans différentes espèces de plantes. La position des cystéines S-nitrosylés est donnée quand elle est connue.

| Protéine | Position | Références |
|---|------------|--|
| <i>Réponse aux stress</i> | | |
| APX (Ascorbate peroxydase) | 32 | Tanou <i>et al.</i> (2009); Fares <i>et al.</i> (2011) |
| CAT (Catalase) | 126 | Tanou <i>et al.</i> (2009) |
| GST (Glutathion S transférase) | | Ji <i>et al.</i> (2002); Fares <i>et al.</i> (2011) |
| NADPH oxydase | 890 | Yun <i>et al.</i> (2011) |
| Déhydroascorbate réductase AtDHAR1 | 20 | Rhee <i>et al.</i> (2005); Fares <i>et al.</i> (2011) |
| AtSABP3 (Salicylic acid binding protein 3) | 280 | Wang <i>et al.</i> (2009) |
| Cu/Zn SOD (Cu/Zn-superoxyde dismutase) | | Lawler & Song (2002) |
| HSP 90, 70 (Heat shock protein 90, 70) | | Tanou <i>et al.</i> (2009) |
| AtNPR1 (Non-protein repressor) 1 | 159 | Tada <i>et al.</i> (2008) |
| RD21 (cystéine protéase) | 59 49 | Fares <i>et al.</i> (2011) |
| <i>Enzymes du métabolisme</i> | | |
| F6PA (Fru 1,6-biphosphate aldolase) | | Fratelli <i>et al.</i> (2002); Tanou <i>et al.</i> (2009) |
| AtTPI1 (Triosephosphate isomérase 1) | 127 218 | Fratelli <i>et al.</i> (2002); Fares <i>et al.</i> (2011) |
| Fructokinase-1 AtFK1 | 298 | Fares <i>et al.</i> (2011) |
| AtAMS1 (S-adénosylmethionine synthétase) | 114 | Lindermayr <i>et al.</i> (2006) |
| Adenosylhomocystéinase | 323 | Yamasaki & Cohen (2006); Fares <i>et al.</i> (2011) |
| Protéines de la photosynthèse | | |
| Rubisco grande sous-unité | | Marcus <i>et al.</i> (2003); Palmieri <i>et al.</i> (2010) |
| Rubisco petite sous-unité | | Motohashi <i>et al.</i> (2001) |
| Rubisco activase, grande sous-unité | | Zhang <i>et al.</i> (2002); Zhang & Portis (1999); Tanou <i>et al.</i> (2009) |
| GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) Chloroplaste | | Motohashi <i>et al.</i> (2001); Kuncewicz <i>et al.</i> (2003); Tanou <i>et al.</i> (2009) |
| <i>Enzymes cytosoliques</i> | | |
| PEPC (phosphoénolpyruvate carboxylase) | | Lindermayr <i>et al.</i> (2005); Abat <i>et al.</i> (2009) |
| ME (Enzyme malic, NADP-dépendante) | | Lindermayr <i>et al.</i> (2005) |
| cGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cytosolique, NADP-dépendante) | | Lindermayr <i>et al.</i> (2005); Holtgreffe <i>et al.</i> 2008 |
| cICDH (isocitrate déshydrogénase cytosolique, NADP-dépendante) | | Motohashi <i>et al.</i> (2001); Tanou <i>et al.</i> (2009); Fares <i>et al.</i> (2011) |

d'électrons. La MDHAR subit une S-nitrosylation lors de la réponse hypersensible chez *Arabidopsis* (Romero-Puertas *et al.*, 2008). Cette enzyme est inhibée par des réactifs modificateurs des groupements thiols (Sano & Asada, 1994), ce qui suggère que la S-nitrosylation pourrait être impliquée dans la régulation de son activité enzymatique.

Tada *et al.* (2008) ont démontré que la S-nitrosylation de la Cys156 dans la protéine NPR1 par GSNO facilite son oligomérisation. La S-nitrosylation est une modification post-traductionnelle qui touche un grand nombre d'enzymes clés dans différentes voies métaboliques telles que la triosephosphate isomérase 1 (tableau. 2). Un deuxième groupe comprend des enzymes impliquées dans le métabolisme du soufre, telles que la cystéine synthase, la S-adenosylhomocystéinase, et la S-adenosylméthionine synthétase (AMS). La S-adenosylméthionine est un précurseur de la biosynthèse d'éthylène. L'éthylène est une molécule très importante dans la signalisation lors des réponses de défense chez les plantes (Dong, 1998; Broekaert *et al.*, 2006). La production de S-adenosylméthionine (SAM) est catalysée par l'AMS qui est codée par quatre isoformes différentes chez *Arabidopsis*. L'isoforme 1 de cette enzyme est inhibée par la S-nitrosylation d'un résidu cystéine situé près du site de liaison du substrat (Lindermayr *et al.*, 2005). L'inhibition de l'activité AMS1 peut induire la diminution des niveaux de SAM et aura donc une incidence sur la biosynthèse de l'éthylène. Cependant, la SAM est également un précurseur de la biosynthèse de polyamines, en particulier la spermidine et la spermine, induisent la biosynthèse rapide de NO chez *Arabidopsis* (Tun *et al.*, 2006). Dans ce contexte, l'inhibition de l'AMS1 est un moyen de contrôler les niveaux intracellulaires de NO (Lindermayr *et al.*, 2006).

La S-nitrosylation peut toucher des enzymes clés du métabolisme carboné et azoté. En effet, plusieurs cibles ont été identifiées dont la glutamine synthase, la GAPDH (cytosolique et chloroplastique), la Rubisco, et la Rubisco activase (Tableau 2). Dans leur travail sur l'effet du GSNO sur l'activité Rubisco, Abat & Deswal (2009) ont montré une inhibition de l'activité Rubisco suite à sa S-nitrosylation chez une plante CAM. Dans le cytosol, une cible intéressante de la S-nitrosylation est la PEPC (Tableau 2). Toutefois, aucune étude n'a examiné l'effet de cette modification post-traductionnelle sur l'activité PEPC. La S-nitrosylation peut toucher également des déshydrogénases cytosoliques NADP-dépendantes (tableau. 2). *In vitro*, une inhibition a été constatée sur la NADP-ICDH (cICDH, Isocitrate déshydrogénase-NADP dépendante) suite à une S-nitrosylation (Yang *et al.*, 2002). Dans la mitochondrie, le NO pourrait moduler la photorespiration par modification des deux enzymes responsables de la conversion de la glycine en sérine, la glycine décarboxylase et la sérine hydroxyméthyltransférase, ainsi considérées comme cibles de S-nitrosylation (Palmieri *et al.*, 2010).

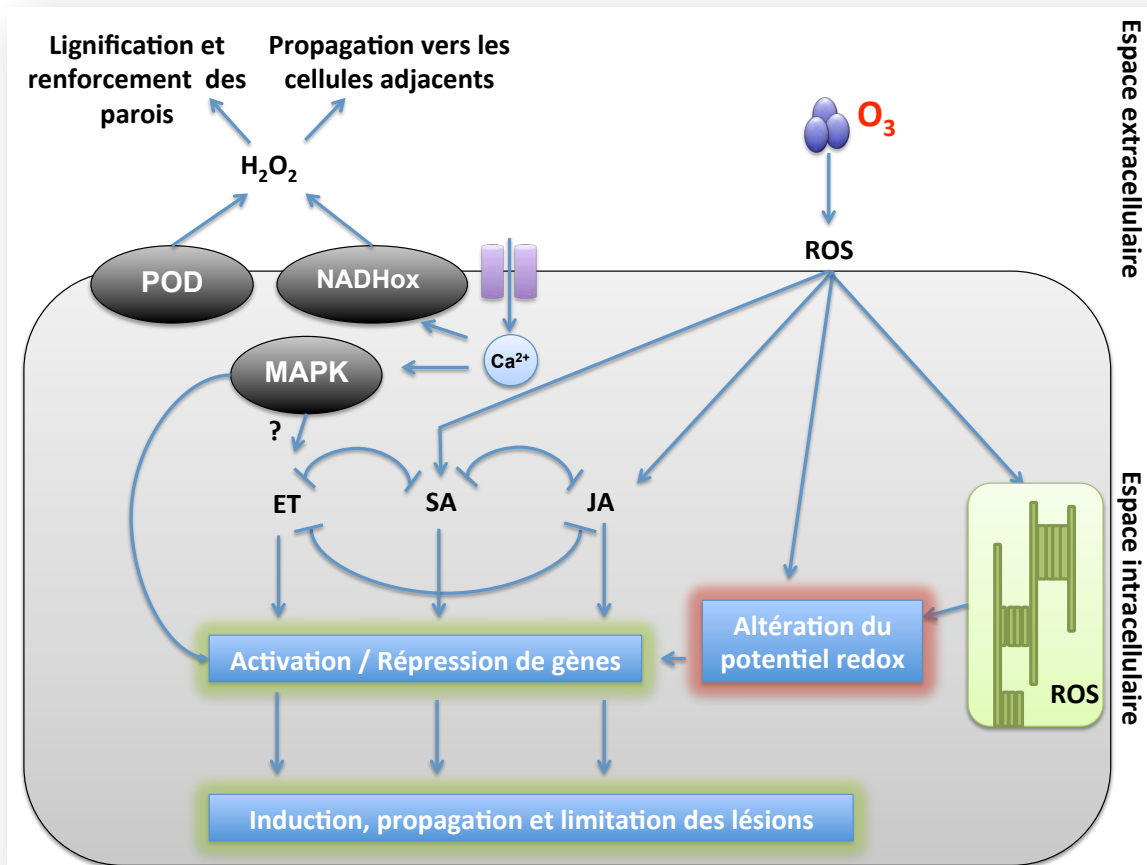


Figure 10. Schéma simplifié de la réponse cellulaire à l'ozone.

La perception des ROS au niveau des cellules de garde induit une production endogène de ROS. Ces ROS sont responsables d'une modulation des niveaux de calcium cytosolique à l'origine d'une activation de NAD(P)H oxydases et de peroxidases (PODs) pH-dépendantes des parois. Ces enzymes vont augmenter la production de ROS (H_2O_2) dans l'apoplasme qui peuvent se propager vers les cellules adjacentes ou avoir un rôle dans la biosynthèse de lignine pour le renforcement des parois. Le signal calcique induit également l'activation d'une cascade MAP kinase à l'origine de l'augmentation d'éthylène (ET) et d'acide salicylique (SA) induisant des lésions au niveau des feuilles, alors que l'acide jasmonique (JA) agit comme antagoniste de cette voie.

D'après: Castagna & Ranieri (2009)

Il faut garder à l'esprit que la S-nitrosylation conduit à des changements non seulement dans l'activité des protéines, mais aussi dans les interactions entre protéines et/ou leur localisation subcellulaire (Benhar & Stamler, 2005), et donc la distribution spatio-temporelle des protéines S-nitrosylées.

2.1.4 Ozone et transduction du signal

L'ozone est connu pour pouvoir induire l'expression de gènes responsables de changements biochimiques qui visent un ajustement métabolique cellulaire, et qui conduisent à long terme à une réponse globale de la plante (Heath, 2008). Les mécanismes qui président à la signalisation cellulaire sous ozone ne sont que partiellement connus (Kangasjärvi *et al.* 2005). Il est convenu que des événements comme la phosphorylation–déphosphorylation rapide de protéines et l'induction de flux calcique peuvent se produire dans les minutes qui suivent le début de l'exposition à l'O₃ (Tamaoki, 2008). Sur un plus long terme, trois principaux mécanismes de signalisation ont été proposés (i) perception par un récepteur protéique apoplasmique, (ii) production de molécules signal de nature lipidique, (iii) changements dans l'équilibre redox cellulaire. Ces événements peuvent se produire simultanément et déclencher une cascade de signalisation. Selon Kangasjärvi *et al.* (2005), au niveau des cellules de garde, l'augmentation des ROS au-delà d'un seuil limite, induit une séquence complexe d'événements qui prend place au niveau des membranes cytoplasmique et chloroplastique. Ces événements conduisent à la production de ROS endogènes, à l'activation d'une signalisation MAP kinases (MAPK, Mitogen–activated protein kinase) et à la transmission du signal aux cellules adjacentes. L'activation de MAPK, à son tour, semble être impliquée dans la régulation de l'éthylène (ET) qui voit sa synthèse augmentée. La présence d'ET et de SA est essentielle pour le développement des lésions induites par l'O₃. Agissant comme antagoniste à cette voie, le JA est nécessaire pour contenir la propagation de la mort cellulaire (Fig. 10). La double analyse, par « microarrays » et RT-PCR en temps réel, a indiqué que, chez *A. thaliana*, la famille de facteurs de transcription WRKY et la cascade MAPK sont des éléments clés de transduction de signal et de voie de perception de l'O₃ (Tosti *et al.*, 2006). L'équipe de Tosti (2006) a aussi suggéré que certains gènes WRKY peuvent être également la cible des MAPK induites par l'O₃, parce qu'ils possèdent des domaines redox sensibles. Ces mêmes domaines peuvent aussi servir pour le contrôle des protéines WRKY *via* la régulation redox. De même, l'activation simultanée des facteurs de transcription WRKY et des kinases de la paroi cellulaire associée (WAK) (gène potentiellement cible des protéines WRKY), a été observée dans le clone de peuplier I-214 en réponse à l'O₃ (150 ppb, 5h) (Rizzo *et al.*, 2007). L'induction de gènes de biosynthèse de l'ET est l'une des premières réponses à l'O₃ (Tuomainen *et al.*, 1997).

La transformation de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) en acide 1-aminocyclopropane 1-carboxylique (ACC) par l'ACC synthase (ACS), est généralement considérée comme l'étape importante de la biosynthèse de l'ET. L'ACC est ensuite converti par l'ACC oxydase (ACO) en ET (Zarembinski & Theologis, 1994). Chez le peuplier (sensible comme tolérant), l'exposition à 150 ppb d'O₃ induit une augmentation transitoire du niveau des transcrits de l'ACS, ce qui entraîne une nette augmentation des pools libres d'ACC à la fin de l'exposition (5h) (Diara *et al.*, 2005).

Une transcription transitoire de l'ACS et de l'ACO a été également observée chez la tomate, où des membres spécifiques de la famille génique des ACS ont été exprimés à des moments et des niveaux différents pendant le temps de l'exposition à l'O₃ et/ou pendant la période de récupération (Castagna *et al.*, 2007). L'inhibition de l'activité ACS empêche l'augmentation de la transcription de gènes de la biosynthèse de l'ET et conduit à la tolérance vis-à-vis de l'O₃, indiquant une régulation rétro-positive par l'ET (Castagna *et al.*, 2007). Il a été démontré que la propagation des lésions et l'étendue de la mort cellulaire sont sous contrôle de l'ET. Une augmentation significative de l'ET a été observée dans le clone sensible *Eridano* (peuplier) (Diara *et al.*, 2005) ainsi que dans le tabac sensible cv BelW₃ (Ederli *et al.*, 2006). La perception rapide du signal ET est un élément clé dans le déclenchement du mécanisme de transduction du signal et, par conséquent, de la réponse biologique sous O₃ (Rao *et al.*, 2002; Tuominen *et al.*, 2004; Kangasjärvi *et al.*, 2005). Chez *Arabidopsis*, en plus de la stimulation de la biosynthèse de l'ET, l'O₃ entraîne la surexpression de certains gènes codant pour les récepteurs ET mais aussi d'éléments de la régulation rétro-négative de l'ET (Tosti *et al.*, 2006). Ceci suggère une extrême coordination des événements liés à la transduction de ce signal. Un rôle central pour SA a également été démontré dans l'initiation et la progression des lésions en réponse à l'O₃ (Rao *et al.*, 2002, Brosché *et al.*, 2010).

L'augmentation du calcium cytosolique (Ca²⁺) est un autre événement de signalisation précoce déclenché par l'exposition à l'O₃ (Clayton *et al.*, 1999). Le calcium est considéré comme un messenger secondaire dans un large éventail de cascade de signalisation chez les plantes (Webb *et al.*, 1996). L'exposition à l'O₃ provoque deux décharges de Ca²⁺ dans le cytosol, la deuxième étant plus longue (30 min) mais plus faible. Le deuxième pic de Ca²⁺ peut être évité par un prétraitement des plantes au chlorure de lanthane, le premier pic restant toujours détectable. En présence de chlorure de lanthane, l'induction de la glutathion-S-transférase (GST), enzyme de défense à capacité anti-oxydante, en réponse à l'O₃, a diminué. Cela suggère que le second pic est nécessaire pour induire l'expression de cette enzyme (Clayton *et al.*, 1999). La réponse du Ca²⁺ biphasique a été observée dans la partie aérienne des plantes, et dépend fortement des niveaux d'O₃ (Evans *et al.*, 2005). Des expériences utilisant des inhibiteurs du métabolisme antioxydant ainsi que des mutants avec une synthèse affaiblie en glutathion montrent que l'induction du premier pic de Ca²⁺ dépend du statut redox cellulaire en particulier des niveaux de glutathion et d'acide ascorbique (Evans *et al.*, 2005).

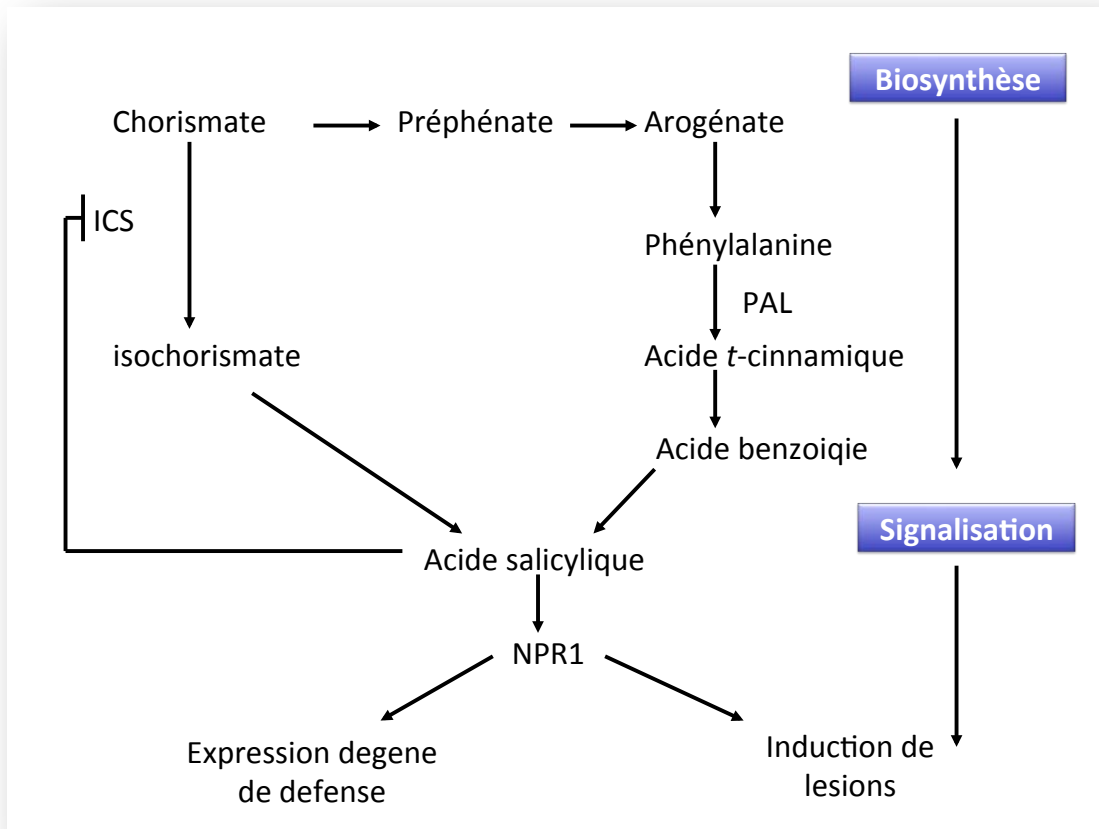


Figure 11. Deux voies possibles de biosynthèse de l'acide salicylique (SA) dans les plantes exposées à l'ozone.

Le mutant d'*Arabidopsis sid2*, déficient en *ICS*, n'accumule pas de SA en réponse à l'O₃, indiquant une synthèse à partir de la voie isochorismate (partant du chorismate). Mais, toujours chez *Arabidopsis*, d'autres évidences supportent la production du SA par la voie phénylalanine ammonia-lyase (PAL) (à partir de l'arogénate). Le SA peut exercer un effet retro-inhibiteur sur l'expression ou l'activité de l'*ICS* et donc inhiber sa propre biosynthèse. NPR1; *nonexpressor of PR-1*.

En plus des changements dans l'expression de certaines enzymes, la libération du Ca^{2+} est susceptible de provoquer la phosphorylation d'enzymes intervenant dans la réponse à l' O_3 telles qu'une des sous-unités de la NADPH-oxydase (Miles *et al.*, 2005). Ceci suggère la participation du Ca^{2+} à la production de ROS (Voir section....NO). Récemment, Kadono *et al.* (2006) ont montré qu'un prétraitement avec des chélateurs de Ca^{2+} inhibe la mort cellulaire induite par l' O_3 dans des cultures en suspension de cellules de tabac (BelW3). Par conséquent, la production du Ca^{2+} par les cellules sous O_3 serait un événement important dans l'activation de la NADPH-oxydase et dans la propagation du signal au cours de la PCD.

2.1.4.1 **L'acide salicylique et l'induction de la mort cellulaire**

La biosynthèse de SA est déclenchée à la suite de divers stress biotiques et abiotiques. Yalpani *et al.* (1994), ont été les premiers à montrer une accumulation de SA sous O_3 . Chez les plantes, il a été longtemps admis que le SA était uniquement synthétisé par l'activité ammoniacale L-phénylalanine-lyase (PAL) à partir de la phénylalanine par de l'acide *trans*-cinnamique et de l'acide benzoïque (León *et al.*, 1993). Une diminution de l'accumulation de SA a été rapportée dans des plantes infectées par des pathogènes et prétraitées par des inhibiteurs de cette voie ou dans des plantes PAL déficientes (Mauch-Mani & Slusarenko, 1996). Toutefois, Wildermuth *et al.* (2001) ont décrit une autre voie de synthèse à partir du chorismate *via* l'isochorismate par action de l'isochorismate synthase (ICS) dans *Arabidopsis* infecté par un pathogène. En outre, dans *Arabidopsis* SID2 (SA-déficient mutant), où l'activité ICS1 est totalement absente, de faibles niveaux d'accumulation de SA sont observés au cours de l'exposition à l' O_3 (Nawrath & Métraux, 1999). Ces résultats suggèrent que chez *Arabidopsis*, la biosynthèse de SA en réponse à l' O_3 se produit en partie par l'intermédiaire de la surexpression de l'ICS1 (Ogawa, 2006). Il faut également noter que SA régule sa propre biosynthèse par un mécanisme de rétro-inhibition de sa propre biosynthèse suite à l'inhibition allostérique de la ICS (Fig. 11). Comme décrit ci-dessus, le SA s'accumule dans les plantes exposées à l' O_3 . Des niveaux élevés de SA ont été corrélés à la formation de lésions dans feuilles.

L'expression de *NahG*, un gène bactérien de la SA hydroxylase (SAH), dans le tabac (cultivar 'Xanthi'), a entraîné non seulement une incapacité à accumuler du SA (Gaffney *et al.*, 1993), mais aussi des lésions réduites en réponse à l' O_3 (Örvar *et al.*, 1997). De même, les écotypes *Arabidopsis* sensibles à l' O_3 , Cvi-0 et le mutant *rcd1* (radical cell death1), qui sont hyper-accumulateurs de SA en réponse à l' O_3 , deviennent nettement plus tolérants à l' O_3 lorsqu'ils sont transformés avec *NahG* ou croisés avec le mutant *NPR1* (Rao & Davis, 1999; Overmyer *et al.*, 2005). De même, une application exogène de SA sur phénotype Col-0 prétraité avec du superoxyde, améliore considérablement l'induction de la mort de cellules (Mazel *et al.*, 2001).

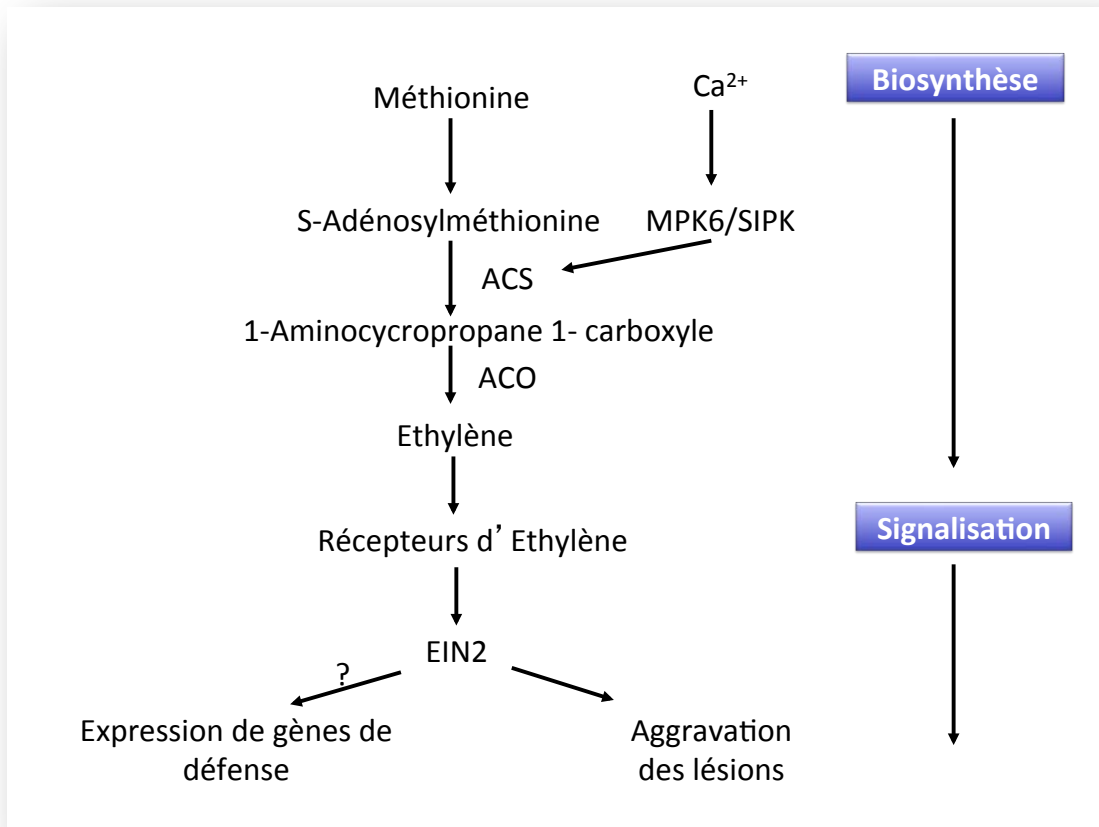


Figure 12. Voie possible de biosynthèse et de signalisation de l'éthylène dans les plantes sous ozone.

L'activité ACC synthase (ACS), enzyme clé de cette voie, est régulée par la MPK6 chez *Arabidopsis*, qui est contrôlée à son tour par le flux du Ca^{2+} cytosolique. Dans cette voie, l'éthylène se lie à l'un de ses récepteurs (exemple : ETR), ce qui permet la transmission du signal *via* EIN2.

Ces résultats indiquent que la production de SA induite par l'O₃ agit comme un signal qui amplifie la mort cellulaire dans un processus similaire à celui observé dans les interactions plantes-pathogènes. Il semble que SA possède une double fonction qui dépend de son niveau de production. En effet, plusieurs études se rejoignent sur la nécessité du SA dans l'induction de réactions de défense à travers l'expression de PR (Brosché & Kangasjärvi 2012). Toutefois, des niveaux élevés peuvent promouvoir la mort cellulaire (Rao & Davis, 1999; Rao *et al.*, 2000; Overmyer *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2009).

2.1.4.2 **Rôle de l'éthylène dans la propagation de la mort cellulaire**

En plus de son rôle dans la croissance des plantes et de leur développement, l'éthylène est impliqué dans la régulation des réponses des plantes aux stress biotique et abiotique. Une augmentation de sa biosynthèse (Fig. 12) se produit lors de contraintes diverses (Zarembinski & Theologis, 1994; Bleecker & Kende, 2000). En règle générale, l'ACS possède un niveau constitutif d'activité très faible, ce qui limite fortement les quantités d'ET dans les tissus végétaux. La production d'éthylène induite par le stress est associée à une augmentation rapide de l'activité cellulaire d'ACS. En revanche, l'ACO présente une activité constitutive élevée. Par conséquent, dans cette voie, l'ACS est une enzyme limitante dans la production d'ET en cas de stress (Bleecker & Kende, 2000). Les isoformes *LeACS1*, *LeACS2*, et *LeACS6* chez la tomate et *StACS4* et *StACS5* chez la pomme de terre sont induites par l'O₃ (Schlagnhauser *et al.*, 1997; Tuomainen *et al.*, 1997). Le génome d'*Arabidopsis* code pour neuf isoformes d'ACS dont huit fonctionnelles (ACS2, ACS4-9, et ACS11 (Tsuchisaka & Theologis, 2004). Parmi ces isoformes, seule l'ACS6 est induite par l'O₃ (Vahala *et al.*, 1998). Une corrélation entre l'induction de l'ACS6 et l'augmentation de l'ET sous O₃ a été observée (Overmyer *et al.*, 2000; Tamaoki *et al.*, 2003). Récemment, une activation d'ACS2 et d'ACS6 après phosphorylation de ces protéines par MPK6 a été observée (Fig. 12) (Liu & Zhang, 2004). Ceci indique que l'évolution de l'ET induite par l'O₃ pourrait être régie non seulement par le niveau de transcription d'ACS6, mais aussi par des modifications post-transcriptionnelles *via* la voie MAPK. L'augmentation de l'ET sous O₃ a été montrée pour la première fois par Craker (1971). Les travaux de Tingey *et al* (1976) montrent une évidente corrélation entre l'étendue des lésions foliaires et les niveaux d'ET induit par l'O₃ dans différentes espèces végétales. Le traitement par des inhibiteurs de biosynthèse de l'éthylène réduit les lésions foliaires sous O₃ (Mehlor *et al.*, 1991). Ces résultats indiquent que l'ET est impliqué dans la promotion et le développement des dégâts sur les feuilles. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme de l'ET dans la promotion des dommages. La première suppose la production de plusieurs substances hautement toxiques telles que des radicaux libres et des aldéhydes par le biais de réactions chimiques directes entre l'ET et l'O₃ (Mehlhorn & Wellburn, 1987).

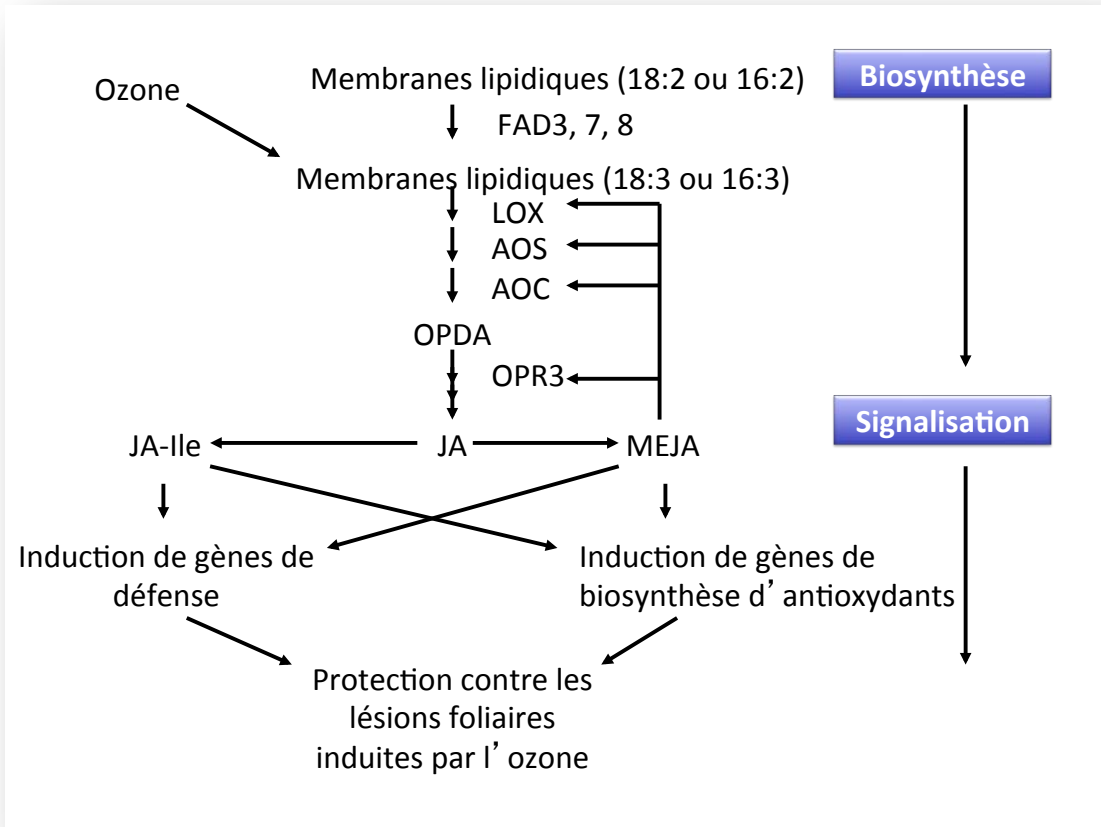


Figure 13. Voies possibles de biosynthèse et de signalisation de l'acide jasmonique dans les plantes sous ozone.

La voie est initiée après peroxydation de différents lipides membranaires. Le JA formé peut se transformer en méthyl JA (MeJA) ou en JA-isoleucine (JA-Ile) qui contribuent à la protection de la cellule de lésions dues à l'ozone par induction de gènes de défenses et/ou ceux qui codent la biosynthèse d'antioxydants.

Le deuxième présente l'ET comme molécule signal à travers sa liaison à un ou plusieurs récepteurs (Bae *et al.*, 1996). Bien que la production d'ET, suite à l'exposition à l'O₃, paraît clairement amplifier le développement des lésions sur les feuilles, les mécanismes d'induction de ces dernières restent à élucider. Récemment, Tanaka *et al.* (2005) ont montré que l'éthylène retarde la fermeture des stomates par la voie de signalisation de l'ABA. L'acide abscissique est impliqué dans plusieurs réponses aux stress abiotiques, il est également bien connu pour son rôle dans la régulation de la fermeture des stomates. Plusieurs auteurs ont relié la fermeture stomatique tardive induite par l'ET à un flux élevé d'O₃ dans les feuilles. Cela peut engendrer une amplification des lésions foliaires (Wilkinson *et al.*, 2011). Le mutant *rcd1* confirme cette hypothèse. Étant hautement sensible à l'O₃, la grande production d'éthylène chez ce mutant est associée à une conductance stomatique plus élevée comparée à celle de Col-0 (Overmyer *et al.*, 2000).

Dans un autre registre, quelques rapports indiquent que l'éthylène inhibe la formation de dommages foliaires provoqués par l'O₃. Par exemple, chez le pois (*Pisum sativum*) et le haricot mungo (*Vigna radiata*), le prétraitement avec de l'ET augmente la tolérance de ces plantes à l'O₃ (Mehlhorn, 1990). Un double rôle de l'ET dans la tolérance à l'O₃ a également été observé dans différents génotypes de bouleau verruqueux (*Betula pendula*, Roth). En fonction de sa concentration intracellulaire, l'ET peut servir de médiateur dans la survie ou la mort cellulaire. Chez *Arabidopsis*, l'ET induit l'expression de nombreux gènes de défense chez le génotype sauvage Col-0, lorsqu'il est comparé au mutant *ein2* (Ethylene insensitive2), déficient dans la voie de biosynthèse de l'ET (Tamaoki *et al.*, 2003). Une étude récente a montré que des niveaux faibles d'ET produit au cours du traitement à l'O₃ sont nécessaires pour favoriser la voie de biosynthèse du glutathion, chélateur puissant de ROS (Yoshida *et al.*, 2009). Ces résultats indiquent qu'un niveau faible et transitoire d'ET, est nécessaire pour l'acquisition d'une tolérance à l'O₃ par l'induction de gènes de défense.

2.1.4.3 **L'acide jasmonique aide à contenir des lésions**

L'acide jasmonique est un dérivé de la voie de biosynthèse des octadécanoïdes, par l'intermédiaire de l'acide linoléique. C'est un composé impliqué dans la signalisation chez les plantes où il régule les réponses aux nombreux stress biotiques et abiotiques (Turner *et al.*, 2002). La principale voie de biosynthèse implique trois enzymes, la lipoxygénase (LOX), l'oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC) (Fig. 13). Une autre voie implique la réduction de l'acide 12-oxo-phytodiénoïque (OP) par l'OP réductase (OPR). L'acide jasmonique carboxyl méthyltransférase génère du méthyle jasmonate (MeJA), qui par rétrorégulation positive induit la transcription des gènes codant pour des enzymes intervenant dans la voie principale de sa biosynthèse et donc dans celle du JA (Sasaki *et al.*, 2001). Une exposition à l'O₃ provoque l'accumulation de JA chez le peuplier (Koch *et al.*, 2000) et induit l'expression des gènes de biosynthèse LOX, AOS et OPR dans divers autres plantes (Mahalingam *et al.*, 2005).

La synthèse de JA ou MeJA a pour but d'induire une réaction de défense contre l'attaque oxydative produite par l'O₃ (Yaeno *et al.*, 2004). Les mutants *Arabidopsis* déficients dans la signalisation JA, *Jar1* (*methyl-jasmonate resistant1*), *coi1* (*coronatine insensitive1*), *oji1* (*ozone-sensitive and jasmonate-insensitive*) sont tous très sensibles à l'O₃ (Overmyer *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2000; Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2005). Un prétraitement avec du MeJA confère une certaine tolérance à l'O₃ chez le tabac et chez *Arabidopsis* (Örvar *et al.*, 1997, Rao *et al.*, 2000). L'inhibition des dommages foliaires dus à l'O₃ pourrait se réaliser en partie grâce à la régulation des récepteurs d'éthylène. Le MeJA induit l'expression de gènes qui codent pour un récepteur de l'éthylène (ERS2) (Schenk *et al.*, 2000). La synthèse *de novo* accrue de ces récepteurs est proposée comme moyen de réduire la sensibilité à l'ET (Ciardi & Klee, 2001) et donc de ralentir la réponse à l'O₃ dépendante de ce composé.

Une autre hypothèse implique l'activation de voies métaboliques de production d'antioxydants. Sasaki-Sekimoto *et al.* (2005) ont montré l'induction par le MeJA des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de l'ascorbate (ASA) (VTC1, VTC2, DHAR et MDHAR) et du glutathion (GSH1 et GSH2) ainsi que leur accumulation.

Pendant l'exposition à l'O₃, ces trois phytohormones (JA, SA, ET) agissent de manière coordonnée et antagoniste. Sous O₃, le mutant *Arabidopsis jar1* accumule non seulement un niveau plus élevé de SA, mais aussi beaucoup plus de transcrits codant PR1, comparé au génotype sauvage (Rao *et al.*, 2000). L'écotype *Arabidopsis Cvi-0*, connu pour être sensible à l'O₃, est capable de produire de grandes quantités de SA et est peu sensible au JA. Ces résultats suggèrent que l'accumulation du SA est régulée négativement par la signalisation de JA qui contrôle entre autre la biosynthèse de l'ET. Le mutant sensible à l'O₃ *oji1* montre une sensibilité réduite au JA et un niveau élevé d'ET (Ishizaki Kanna *et al.*, 2004). Le traitement de ce mutant avec du JA réduit la production d'ET et sa sensibilité à l'O₃. Le même comportement a été signalé chez le mutant sensible *rcd1*. Ces résultats indiquent que le JA régule négativement la voie de signalisation qui met en œuvre ces trois phytohormones.

2.1.5 Mécanismes de détoxification des ROS : de l'apoplasme au symplasme

Comme mentionné ci-dessus, le niveau des ROS produits suite à l'exposition à l'O₃ doit être finement régulé de manière positive grâce à une seconde cascade de signalisation cellulaire (incontrôlée), sans pour autant induire immédiatement la mort cellulaire. Il est connu que les ROS sont physiologiquement générés à partir de diverses sources au cours du métabolisme cellulaire de base. À la lumière de cet aspect physiologique, au cours de leur évolution, les plantes se sont accommodées par l'élaboration de nombreux et très efficaces systèmes anti-oxydants de nature enzymatique et non-enzymatique.

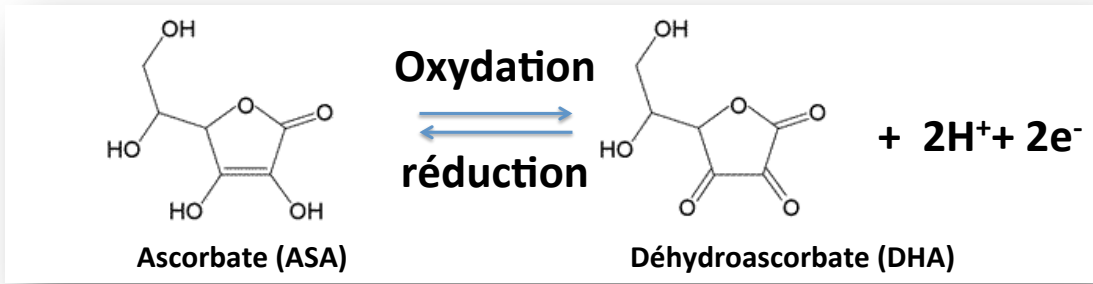


Figure 14. Réaction d'oxydation de l'ascorbate (ASA) en déhydroascorbate (DHA), après réaction avec une molécule de peroxyde d'hydrogène.

Ces systèmes sont capables de détoxifier une quantité considérable de ROS et jouent donc un rôle crucial dans la destinée de la cellule, non seulement par le maintien des niveaux de ROS sous contrôle mais aussi comme composantes indissociées de la balance redox et de la modulation du signal intracellulaire. La première ligne de défense contre l'O₃ et ces dérivés ROS est l'apoplasme, où la présence d'ascorbate (ASA) fournit une protection importante contre les dommages oxydatifs (Fig. 14). Appartenant à la famille des lactones, l'ASA est une molécule de faible masse moléculaire présente dans tous les compartiments cellulaires. Sa grande réactivité et son transport facile, font de cet antioxydant un pilier du système de défense non-enzymatique contre les ROS. Castillo & Greppin(1988) et Luwe *et al.* (1993) sont les premiers à rapporter des changements de niveau d'ASA dans l'apoplasme et l'état redox-induit par l'O₃. D'autres travaux publiés par la suite (Ranieri *et al.*, 1996; 1998; 1999) ont appuyé l'hypothèse du rôle que joue cet ASA lors du stress. Ces études ont comparé deux types de feuilles de citrouille exposées à 150 ppb (O₃ 5 h j⁻¹, 5 jj) jeunes asymptotiques et matures symptomatiques. Les deux types de feuilles affichent des niveaux d'ASA apoplasmique élevés, tandis que les concentrations intracellulaires ne varient pas. Les auteurs proposent l'hypothèse d'une stimulation de la synthèse de l'ASA induite par l'O₃ suivie par son exportation active vers l'apoplasme (Ranieri *et al.*, 1996). Le rôle protecteur de l'ASA comme chélateur de ROS est également confirmé par une sensibilité accrue des mutants *A.thaliana* déficients dans la synthèse de l'ASA (Conklin *et al.*, 1997) et pour des tabacs transgéniques qui surexpriment l'ascorbate oxydase (Sanmartin *et al.*, 2003). Encore aujourd'hui, les concentrations exactes d'O₃ qui peuvent être efficacement détoxifiées par l'ASA apoplasmique sont toujours mal connus. Le rôle de ce métabolite et sa relation avec la tolérance ou la sensibilité à l'O₃, reste donc à élucider.

Ranieri *et al.* (1996) ont signalé que dans les feuilles matures de citrouille montrant des lésions, le système de défense était plus stimulé que dans les feuilles jeunes (FJ) toujours intactes. Ce qui laisse penser que des facteurs supplémentaires antagonistes devraient entrer en jeu dans les effets toxiques de l'O₃. De même, une étude récente par D'Haese *et al.* (2005), rapporte que l'ASA apoplasmique ne pourrait à lui seul expliquer une différence de tolérance à l'O₃ chez des clones de *Trifolium*. En fait, contrairement à ce qu'on pouvait attendre, le clone sensible montre une plus grande concentration constitutive d'ASA apoplasmique et également un état redox plus élevé que celui du clone tolérant. Le manque d'une relation directe entre concentration de l'ASA apoplasmique et sensibilité à l'O₃ a été confirmé dans des feuilles de soja, en raison d'un pourcentage élevé d'ASA extracellulaire sous sa forme inactive oxydée qui s'élève à 70-97%. Par conséquent, d'autres molécules extracellulaires de nature antioxydante devraient entrer en jeu pour contrer les effets négatifs générés par les ROS (Cheng *et al.*, 2007). Un modèle simple de calcul développé par Chameides (1989), qui simule le transfert de l'O₃ de l'atmosphère vers le mésophylle, a permis de quantifier la capacité d'ASA apoplasmique à limiter le flux d'O₃ à travers les parois.

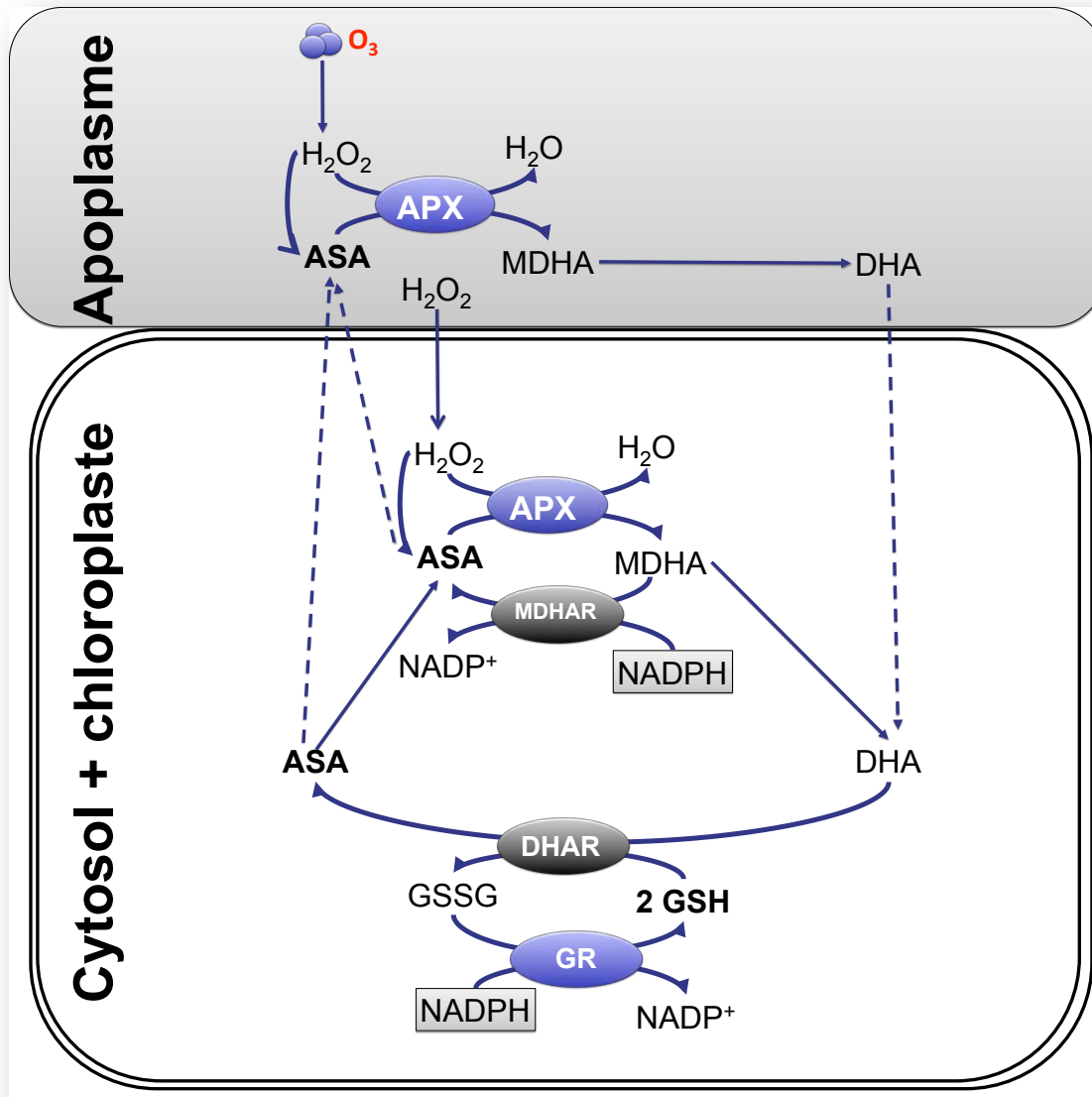


Figure 15. Réaction d'oxydation de l'ascorbate dans l'apoplasme et le symplasme dans une cellule végétale sous ozone.

L'ascorbate réduit (ASA), oxydé par les ROS, par l'ozone directement ou par l'action de l'ascorbate peroxidase (APX), réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), puis est recyclé par le cycle Halliwell-Asada. Ce cycle qui implique la déhydroascorbate réductase couplée à la glutathion réductase, comprend également dans le cytosol la régénération de l'ASA par l'intermédiaire de la monodéhydroascorbate réductase NADP-dépendante. APX, ascorbate peroxidase; ASA, ascorbate réduit; DHA, déhydroascorbate; DHAR, déhydroascorbate réductase; GR, glutathion réductase; GSH, glutathion réduit; GSSG, glutathion oxydé; MDA, monodéhydroascorbate; MDAR, monodéhydroascorbate réductase.

D'après: Castagna & Ranieri (2009).

L'application de ce modèle de calcul sur deux clones de peupliers de sensibilités différentes, a permis d'établir que la réaction directe de l'ASA avec l'O₃ a peu d'impact sur les flux d'O₃ à travers le plasmalemme, en raison de la faible épaisseur des parois et de la très faible (même si elle est significative) augmentation des concentrations extracellulaires de l'ASA (Ranieri *et al.*, 1999). De même, Kollist *et al.* (2000) montrent que dans le blé et l'orge, l'élimination de l'O₃ par l'ASA apoplasmique n'a pas d'importance majeure puisque les parois des cellules du mésophylle sont minces et que la longueur du trajet de l'O₃ pour atteindre le site de la réaction est très courte. L'ASA est synthétisé à l'intérieur de la cellule et sa forme oxydée (Déshydroascorbate, DHA) doit être redirigée vers le symplasme pour être réduite à nouveau (Fig. 15). Pour cela, le rendement du transport à travers la membrane plasmique est un paramètre important dans l'efficacité de sa capacité antioxydante face à l'O₃. Dans l'apoplasme de la citrouille, la forme réduite de l'ASA augmente beaucoup plus que sa forme oxydée, ce qui augmente l'état redox à des niveaux plus élevés que ceux enregistrés dans les plantes contrôle (Ranieri *et al.*, 1996). Le rôle antioxydant joué par ASA dépend strictement de la capacité cellulaire à le maintenir dans un état réduit. Habituellement, ceci se produit au détriment du glutathion réduit (GSH) par l'action de la monodéshydroascorbate réductase (MDHAR) ou de la déshydroascorbate réductase (DHAR). La forme réduite du glutathion est un puissant chélateur de radicaux libres. Après les protéines, le glutathion est le tripeptide (gamma-glutamyl-cystéine-glycine) qui forme la réserve thiols la plus importante dans la cellule. Véritable molécule tampon, il affecte l'état d'oxydation de nombreuses autres molécules. Outre son rôle antioxydant, le GSH est aussi impliqué dans la régulation du métabolisme et notamment du développement cellulaire (Ogawa, 2005). La forme réduite, monomérique, est la forme prépondérante en conditions physiologiques optimales. Le dimère qui constitue la forme oxydée GSSG, se forme par une liaison type pont disulfure. Le pouvoir réducteur du GSH est utilisé par diverses activités enzymatiques comme les glutarédoxines (Grx), les glutathion-transférases (GST), ainsi que certaines peroxyrédoxines (Prx). En se fixant sur leurs résidus cystéines, encore appelé glutathionylation, le GSH peut réguler ou offrir une protection antioxydante pour certaines protéines cibles (Cabiscol & Levine, 1996).

Dans le cycle de l'ascorbate-glutathion, la glutathion réductase NADPH-dépendante (GR) génère deux GSH en réduisant une molécule de GSSG. Le pouvoir réducteur est fourni par une molécule de NADPH (Fig. 16). Ceci se réalise à la fois dans plusieurs compartiments cellulaires (Noctor & Foyer, 1998). L'augmentation induite par l'O₃ du pouvoir réducteur cellulaire détecté chez le trèfle blanc et le trèfle rouge peut suggérer une régénération très rapide et efficace de la forme réduite de l'ASA suite à une augmentation de l'activité MDHAR. Toutefois, l'activité GR n'est pas modifiée, ce qui peut conduire à la baisse du niveau de GSH chez le trèfle rouge sensible (Scebba *et al.*, 2003).

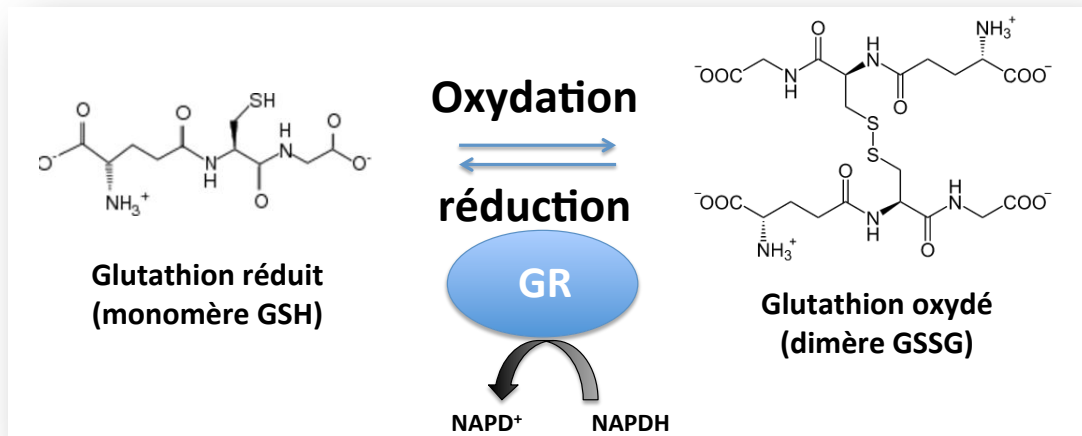


Figure 16. Réaction catalysée par la glutathion réductase (NADP-dépendante).

GSSG, glutathion oxydé; GSH, glutathion réducté.

Chez le tabac cv W3 Bel, aucune corrélation entre l'état redox du glutathion et l'activité de la GR n'a été remarquée. Cela suggère un équilibre entre synthèse et dégradation du glutathion qui serait déterminant pour le contenu du GSH, plutôt qu'une modulation de l'activité GR (Pasqualini *et al.*, 2001). Les principaux facteurs contrôlant la synthèse du glutathion dans les plantes et sa disponibilité est l'activité de la cystéine γ -glutamyl synthétase (γ -ECS) (Noctor, 2006). Chez le peuplier, l'expression des isoformes γ -ECS n'a pas été influencée par l' O_3 , mais l'activité était deux fois plus élevée dans I-214 que dans Eridano, reflétant parfaitement le comportement du pool glutathion (Di Baccio *et al.*, 2008). De même que pour le tabac (Pasqualini *et al.*, 2001), le peuplier a montré une grande différence inter-clonale dans la taille et l'état redox du pool de glutathion, avec un meilleur pouvoir antioxydant dans le clone tolérant (Di Baccio *et al.*, 2008). En plus d'une neutralisation par réaction directe avec les ROS, l'ASA peut servir de substrat pour l'ASA peroxydase (APX) (Fig. 15). Cette enzyme est reconnue comme l'un des systèmes les plus efficaces contre les ROS (Foyer *et al.*, 1994) en raison de sa forte affinité pour l' H_2O_2 et sa présence dans différents compartiments cellulaires comme les chloroplastes, le cytosol, les peroxysomes et les mitochondries (Mittler & Zilinskas, 1991; Miyake & Asada, 1992; Jimenez *et al.*, 1997). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques lors de l'exposition à l' O_3 a pu révéler un rôle fondamental dans la réduction de l' H_2O_2 (Castillo & Greppin, 1986; Peters *et al.*, 1989). Chez le tournesol, la stimulation de l'activité extracellulaire de l'APX peut contribuer à éviter l'accumulation toxique de l' H_2O_2 (Ranieri *et al.*, 2003). Cette enzyme à hème, catalyse la réduction de l' H_2O_2 en O_2 en utilisant le pouvoir réducteur d'une molécule d'ASA. L'activité constitutive forte de l'APX mesurée dans un clone résistant de trèfle a été encore plus stimulée à la suite d'une exposition prolongée à l' O_3 , suggérant un rôle dans la tolérance vis-à-vis de ce stress oxydatif (Naliet *et al.*, 2005).

Autre que ces enzymes, le système antioxydant peut faire intervenir en plus diverses enzymes capables de prendre en charge les ROS. Les catalases (CAT) sont des enzymes à hème. La forme tétramérique active catalyse efficacement la réduction de l' H_2O_2 en H_2O . La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la réduction de l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en H_2O_2 , qui sera à son tour réduit par les enzymes déjà citées ou par d'autres peroxydases comme la glutathion peroxydase (GPX).

D'autres mécanismes non enzymatiques sont présents et disponibles pour la cellule afin de faire face au stress oxydatif induit par l' O_3 . En effet, grâce à leur pouvoir antioxydant, de nombreux composés phénylpropanoïdes jouent un rôle dans la défense des plantes contre différents stress environnementaux (Dixon & Paiva, 1995; Booker & Miller, 1998; Cabané *et al.*, 2004). Sous O_3 , la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est sujette à une induction des gènes qui la composent. Entre autres, la shikimate déshydrogénase (SKDH) est une des enzymes clés de la voie shikimate, voie responsable de la production de nombreux acides aminés aromatiques (Aaa) et d'un grand nombre de composés phénoliques.

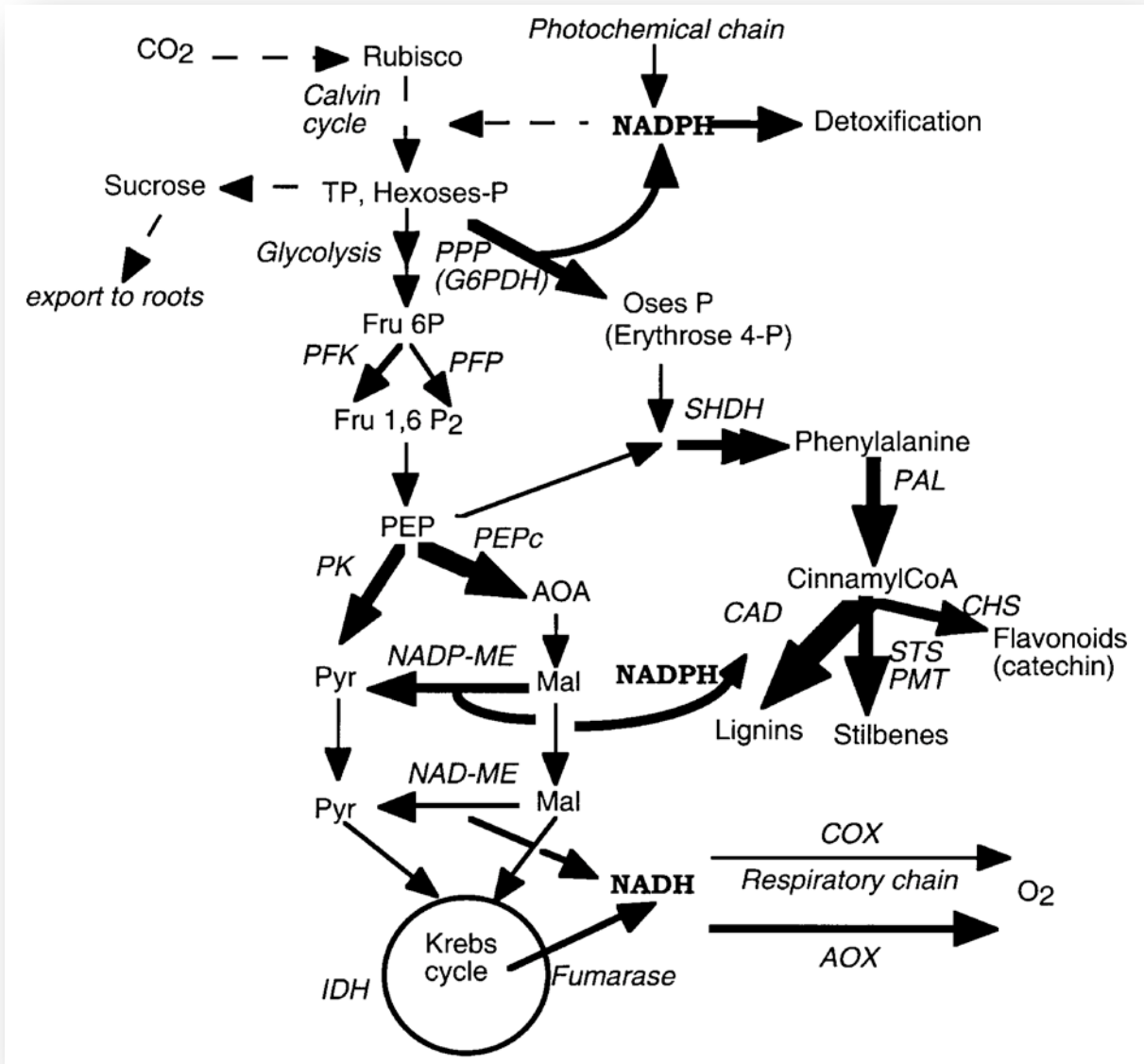


Figure 17. Effets de l’ozone sur les voies métaboliques et les enzymes associées au métabolisme carboné des arbres.

Les flèches en pointillés indiquent une inhibition, les flèches pleines une stimulation, d’autant plus forte que le trait est épais. AOX, alternative oxydase; CAD, cinnamyl alcool déshydrogénase; CHS, chalcone synthase; COX, cytochrome oxydase; G6PDH, glucose 6-phosphate déshydrogénase; IDH, isocitrate déshydrogénase; ME, enzyme malique (à NAD et NADP); PAL, phénylalanine ammonia lyase; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; PFK, phosphofructokinase; PFP, pyrophosphate fructose 6-phosphate phosphotransférase; PK, pyruvate kinase; PPP, voie des pentoses phosphate; PMT, pinosylvine méthyl transférase; SHDH, shikimate déshydrogénase; STS, stilbène synthase.

Source : Dizengremel (2001). Traduction en français de la légende Bagard (2008)

La première enzyme régulatrice de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est la PAL, qui, en convertissant la phénylalanine en l'acide *t*-cinnamique, initie le métabolisme des phénylpropanoïdes secondaires (Fig. 17). Plusieurs voies qui se ramifient à partir de la voie PAL peuvent être induites sous O₃, comme celle de la cinnamyle alcool déshydrogénase (CAD), une enzyme qui rentre dans la biosynthèse des lignines (Cabané *et al.*, 2004), la stilbène synthétase (STS), la pinosylvine méthyl-transférerase (PMT), et la chalcone synthétase (CHS) (Dizengremel, 2001) (Fig. 17). Bien que stimulées sous O₃, aucune relation directe entre ces voies et une amélioration de la tolérance n'a été établie.

2.1.6 Effet de l'ozone sur le métabolisme carboné primaire

2.1.6.1 *Processus photosynthétique et respiratoires*

Les systèmes de détoxification des végétaux, présents dans l'apoplasme, le cytosol et divers organites, contribuent activement à la neutralisation des ROS et des RNS. Cependant, l'impact négatif de l'O₃ sur la photosynthèse peut toujours survenir, particulièrement dans le cas de périodes prolongées de stress (Pell *et al.*, 1992; Dizengremel *et al.*, 1994; Bagard *et al.*, 2008; Heath, 2008). Simultanément, les plantes sont susceptibles, sous O₃, d'augmenter les processus cataboliques entraînant la production de squelettes carbonés et de pouvoir réducteur ce qui permettrait de maintenir les mécanismes de détoxification cellulaire (Dizengremel, 2001; Dizengremel *et al.*, 2008). Une grande partie des squelettes carbonés semble être détournée vers les voies de biosynthèse de composés secondaires (flavonoïdes, composés phénoliques, lignine ...), supposés jouer un rôle dans les mécanismes de défense (Booker & Miller, 1998; Dizengremel, 2001; Cabane *et al.*, 2004; Castagna & Ranieri, 2009) (section 5.5). Dans les plantes émettant des VOC (exemple les isoprénoïdes), une partie du carbone pourrait être réorientée vers leur production, ce qui semble être une des stratégies de protection utilisée par les plantes sous O₃ (Loreto *et al.*, 2001).

Dans leur lettre adressée à *New Phytologist*, Dizengremel *et al.* (2012) mettent le PEP au centre de quatre voies métaboliques importantes dans la réponse à l'O₃ (Fig. 18). (1) La respiration mitochondriale avec le cycle de Krebs comme principal acteur, et où se réalise également les réactions de la chaîne respiratoire produisant de l'ATP en utilisant le NADH, (2) la formation d'isoprénoïdes dans les chloroplastes par l'intermédiaire du méthylérythritol-4-phosphate (MEP) et commençant par la condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde 3-phosphate, (3) la voie des shikimate-phénylpropanoïdes dans le chloroplaste qui après la condensation du PEP en présence d'érythrose 4-phosphate donne des acides aminés aromatiques (Aaa), qui constituent les précurseurs des composés phénoliques, (4) la voie anaplastique dépendante de l'activité PEPC.

2.1.6.2 *La respiration mitochondriale*

Lors de l'exposition à l'O₃, plusieurs enzymes cytosoliques telles que la pyruvate kinase (PK), subissent une augmentation de leurs activités enzymatiques (Dizengremel *et al.*, 1994; Gaucher *et al.*, 2003).

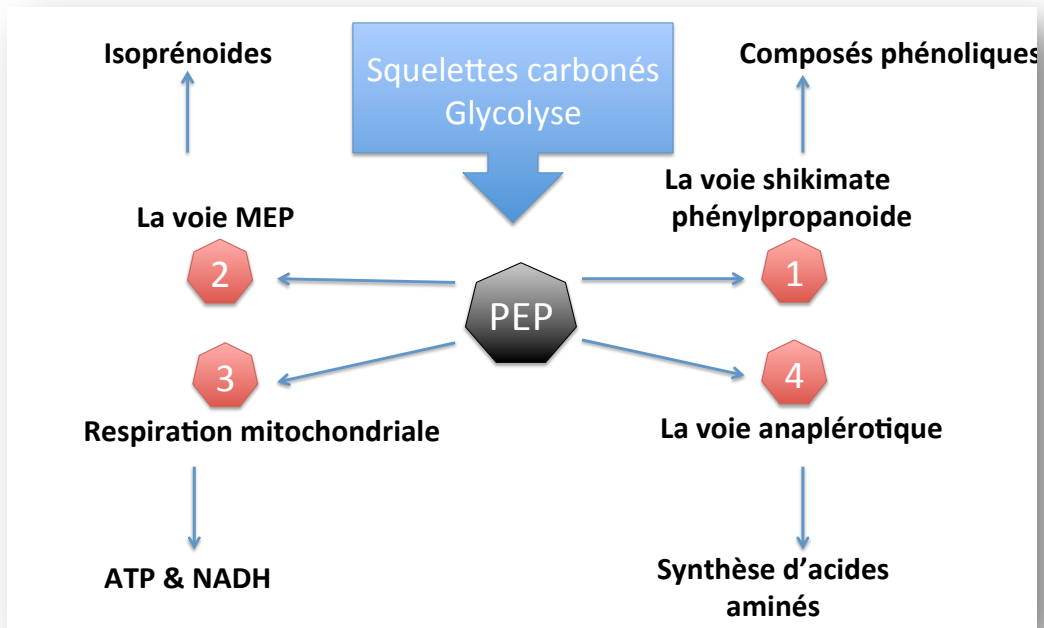


Figure 18. Le rôle central du phosphoénolpyruvate dans le fonctionnement des différentes voies métaboliques.

PEP, phosphoénolpyruvate; MEP, 2-C-méthylérythritol-4-phosphate.

D'après : Dizengremel et al. (2012)

Il en est de même pour l'enzyme malique à NAD et la fumarase dans les mitochondries (Dizengremel *et al.*, 2009). Dans la mitochondrie, l'activité photorespiratoire associée à la glycine décarboxylase (GDC) produit du NADH, ce qui induit la rétro-inhibition des déshydrogénases du cycle de Krebs (Igamberdiev & Gardeström, 2003) (Igamberdiev & Gardeström, 2003). L'ozone induit une diminution de la photorespiration (Bagard, 2008), ce qui conduirait vraisemblablement à la diminution du taux de NADH/NAD⁺ qui pourrait expliquer l'augmentation de la respiration mitochondriale (Fig. 17).

2.1.6.3 **La voie MEP**

La demande en PEP est dirigée en particulier vers la biosynthèse des isoprénoïdes chez les plantes qui produisent et émettent de l'isoprène après une exposition à l'O₃ (Valkama *et al.*, 2007). Dans ce cas particulier, cette biosynthèse endogène d'isoprène est connue pour jouer un rôle antioxydant (Loreto *et al.*, 2001) et/ou prévenir des dommages liés au transport d'électrons photosynthétiques (Magel *et al.*, 2006). La synthèse d'isoprène est positivement corrélée au taux de respiration mitochondriale, mais elle s'est avérée négativement corrélée à une augmentation de l'activité PEPC (Loreto & Fares, 2007).

2.1.6.4 **Les voies shikimate et phénylpropanoïdes**

L'ozone induit la transcription des gènes ainsi que l'activité d'un grand nombre d'enzymes chloroplastiques appartenant à la voie shikimique et à celle des phénylpropanoïdes qui conduisent à la production de flavonoïdes et de composés phénoliques (Booker & Miller, 1998; Cabane *et al.*, 2004; Betz *et al.*, 2009). Les activités shikimate déshydrogénase, phénylalanine ammonia-lyase et alcool cinnamyle déshydrogénase sont stimulées par l'O₃, ce qui conduit à une légère augmentation de la quantité de lignines ainsi qu'à des changements dans leur composition (Cabané *et al.*, 2004; Betz *et al.*, 2009).

2.1.6.5 **La voie anaplérotique**

Lors d'un stress O₃, la forte augmentation de l'activité de la PEPC conduit à suggérer que la voie anaplérotique au fonctionnement du cycle de Krebs est activée (Dizengremel, 2001 ; Dizengremel, 2009). Chez les plantes C₃, la Rubisco est la principale enzyme de carboxylation et d'assimilation de CO₂. La stimulation de l'activité PEPC, enzyme cytosolique, laisse penser à une meilleure récupération du CO₂ respiratoire, postérieurement incorporé dans la voie anaplérotique (Melzer et O'Leary, 1987). Sous O₃, les activités enzymatiques de ces protéines se comportent différemment. D'une part, une diminution de l'activité Rubisco est communément observée, alors qu'une forte augmentation de l'activité de la PEPC se produit (Landolt *et al.*, 1997; Fontaine *et al.*, 1999; Dizengremel, 2001; Renaut *et al.*, 2009).

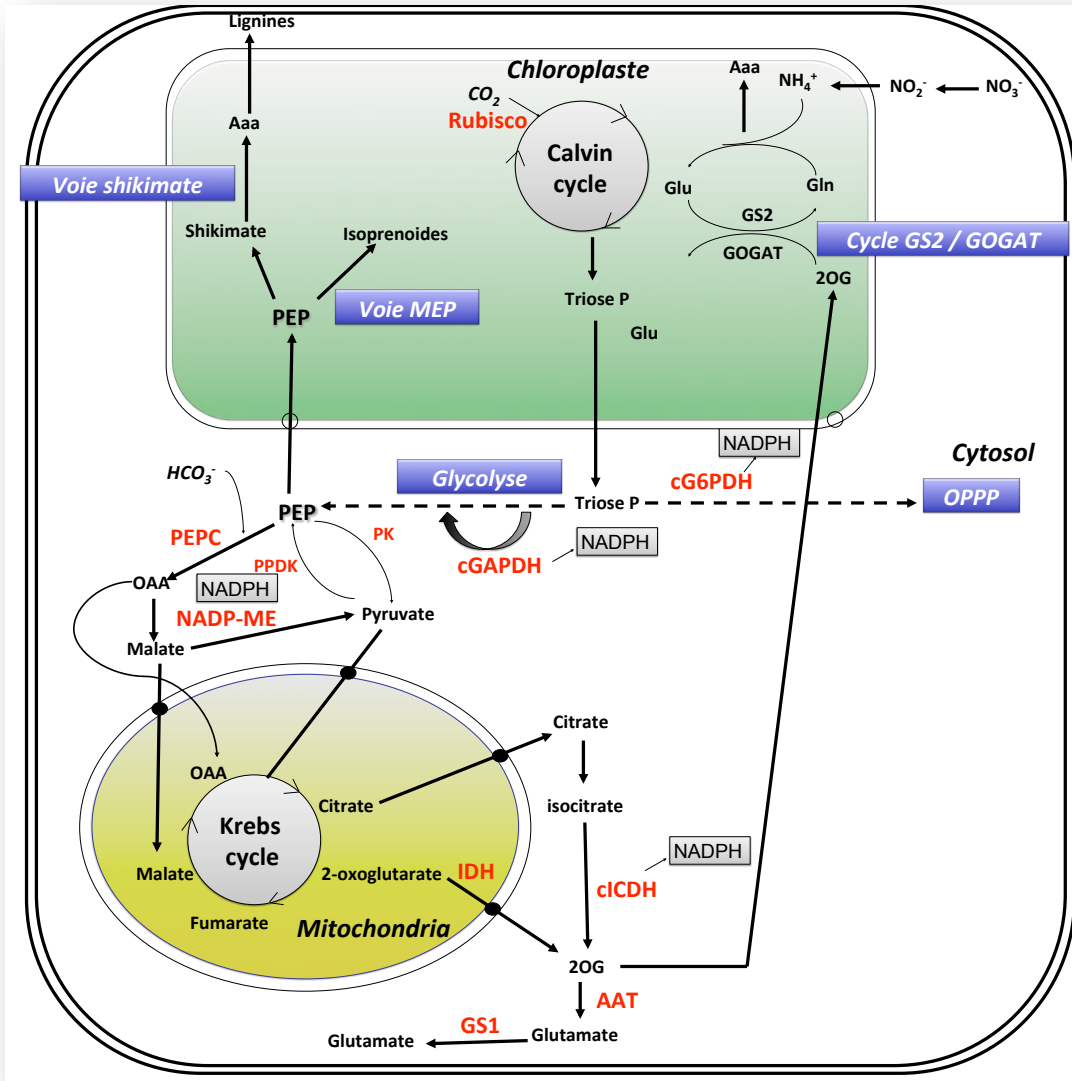


Figure 19. Schéma métabolique représentant le phosphoénolpyruvate (PEP) au coeur de différentes voies associées qui peuvent être affectées par l' O_3 .

AAT, aspartate aminotransférase; Aaa, acides aminés aromatiques; Gln, glutamine; GOGAT, glutamate oxoglutarate aminotransférase; GS, glutamine synthétase, Glu, glutamate; IDH, isocitrate déshydrogénase; cICDH, isocitrate déshydrogénase cytosolique NADP-dépendante; OAA, acide oxaloacétique; OG, oxoglutarate; OPPP, lvoie des pentoses phosphates; NADP-ME, enzyme malique NADP-dépendante; MEP, methylerythritol 4-phosphate; PEPC, PEP carboxylase; PDK, phosphodikinase pyruvate; PK, pyruvate kinase.

D'après : Dizengremel *et al.* (2012)

Chez les plantes C3, la PEPC peut soutenir et alimenter les interactions carbone-azote (C/N). Elle peut également intervenir lors de la formation de graines, la germination, la maturation des fruits et soutenir le métabolisme des cellules de garde lors du mécanisme d'ouverture/fermeture des stomates. Elle peut intervenir aussi sur la fourniture du malate comme substrat respiratoire pour les bactéries symbiotiques lors de la fixation d'azote (N_2) dans les nodules des racines des légumineuses (Brendan *et al.*, 2011). Enfin, la PEPC est traditionnellement connue pour son rôle dans la voie anaplérotique, où, à partir du PEP, elle alimente le cycle de l'acide tricarboxylique en squelettes carbonés tel que l'oxaloacétate (OAA) et le malate essentiels pour l'anabolisme. Bien que cette définition soit valide, ceci est une simplification de sa contribution totale dans le métabolisme primaire et ceci pour plusieurs raisons. Premièrement, combinée avec la malate déshydrogénase (MDH) et l'enzyme malique $NADP^+$ -dépendante (ME), la PEPC forme un mode de flux alternatif qui génère du pyruvate et qui peut fonctionner en parallèle avec la voie pyruvate kinase cytosolique (PKC) (Fig. 19) (Plaxton & Podestá, 2006; Sweetlove *et al.*, 2010). Deuxièmement, la transformation du PEP en malate peut contribuer à l'équilibre ($NAD(P)H/NAD(P)^+$) dans le cytosol consécutivement à l'activité de la ME. Par ailleurs, le malate cytosolique oxydé en pyruvate par divers isoformes d'enzyme malique (ME) peut être transporté vers différents organites cellulaires (mitochondries, plastes) et ainsi servir de source de carbone ou de fournisseur de pouvoir réducteur ($NAD(P)H$) (Fig. 19) qui améliorerait la capacité de défense de la cellule face au stress. En effet, plusieurs études montrent une activation de la ME liée à la réponse métabolique des plantes à de multiples stress comme le stress hydrique (Valderrama *et al.*, 2006; Cheng & Long, 2007), les stress biotiques (Maurino *et al.*, 2001; Doubnerová *et al.*, 2009) et la pollution au cadmium (Smeets *et al.*, 2005; Krantev *et al.*, 2008) et surtout en réponse à l' O_3 (Fontaine *et al.*, 1999; Dizengremel *et al.*, 2009; Guidi *et al.*, 2009). Troisièmement, les acides organiques générés consécutivement à l'activité de la PEPC, outre le fait qu'ils puissent approvisionner le cycle de Krebs, vont avoir plusieurs rôles (Ferne & Schauer, 2009). Dans le cytosol, l'OAA peut conduire à la synthèse d'aspartate mais après son transfert (ou celui du malate) dans la mitochondrie il peut également alimenter différentes voies de synthèse des acides aminés (Fig. 19). Dans les feuilles éclairées, le citrate exporté de la mitochondrie est par la suite transformé en 2-oxoglutarate (2OG) dans le cytosol par l'isocitrate déshydrogénase $NADP$ -dépendante (cICDH)). Le 2-oxoglutarate peut également être produit dans la mitochondrie et exporté directement dans le cytosol. La transformation du citrate en 2OG par la cICDH induit la production du NADPH. Ce dernier peut servir comme cofacteur pour diverses réactions de détoxication. En effet, l'augmentation de l'activité cICDH a été liée à la réponse des plantes au stress oxydatif comme l' O_3 (Møller & Rasmusson, 1998; Hodges, 2002; Hodges *et al.*, 2003).

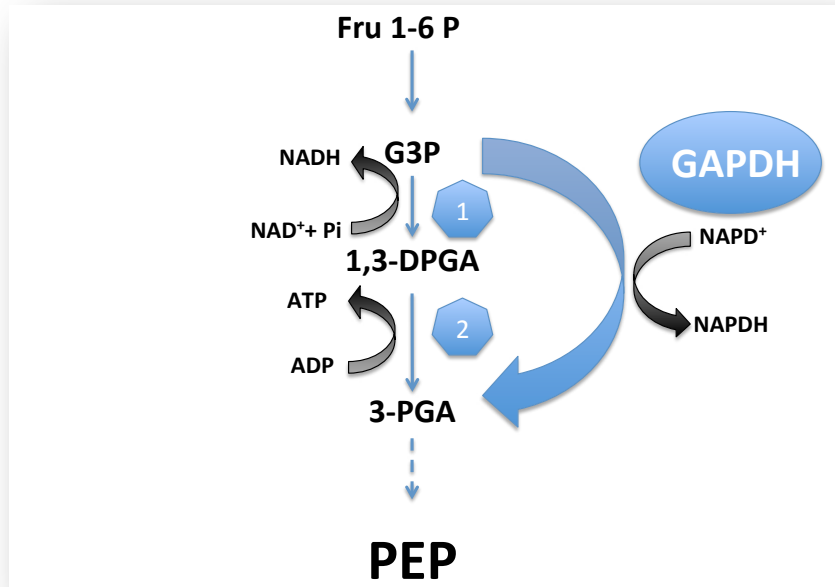


Figure 20. Réaction catalysée par la GAPDH NADP-dépendante (cGAPDH), shunt au sein des réactions de la glycolyse chez les plantes.

1,3-DPGA, 1,3-bisphosphoglycerate; 1, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase; 2, phosphoglycérate kinase; 3-PGA, 3-phosphoglycerate; Fru 1-6 P, fructose 1-6 bisphosphate; G3P, glycéraldéhyde-3-phosphate; PEP, phosphoénolpyruvate.

Il a été suggéré que le NADPH produit par cette enzyme contribue au maintien de l'homéostasie redox, non seulement en réponse aux stress abiotiques (Dizengremel, 2001, Smeets *et al.*, 2005, Leterrier *et al.*, 2012), mais aussi dans le cas d'attaques pathogènes (Mhamdi *et al.*, 2010b). L'augmentation de l'activité cICDH peut également faire partie de l'ensemble de réactions qui impliquent la production d'acides aminés pour maintenir les cellules ou les processus de réparation (Dizengremel *et al.*, 2009). En effet, le 2OG produit peut être importé dans les chloroplastes pour intégrer la voie de synthèse de glutamate du cycle GS/GOGAT (GS2)/glutamate 2-oxoglutarate aminotransférase (GOGAT). Une autre voie cytosolique peut transformer le 2OG en glutamate par l'action de l'aspartate aminotransférase (AAT). Ce glutamate peut être aminé par la glutamine synthétase 1 (GS1) pour donner de la glutamine.

2.1.7 Glycolyse et voie des pentoses phosphates

L'enchaînement des réactions qui mènent au PEP dans le cytosol, appartient à la glycolyse. Cette voie est stimulée sous O₃ (Dizengremel, 2001). L'importance de la glycolyse dans la fourniture du pouvoir réducteur se matérialise par la présence d'un shunt représenté par la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase NADP dépendante (cGAPDH). Cette enzyme catalyse la conversion du Ga3P en 3-phosphoglycérate et produit du NADPH (fig. 20). Cet NADPH, peut servir à maintenir les niveaux du pouvoir réducteur cellulaire, notamment en cas de stress (Habenicht *et al.*, 1997), ou être utilisé dans la synthèse des sucres (Rumpho *et al.*, 1983).

Sous O₃, la stimulation de la voie des pentoses phosphates se traduit par une augmentation de l'activité glucose-6-phosphate déshydrogénase NADP-dépendante (cG6PDH) (Fontaine *et al.*, 1999; Dizengremel, 2001; Gaucher *et al.*, 2006). Le NADPH produit par cette enzyme est supposé avoir un rôle important dans l'approvisionnement en pouvoir réducteur lors de scénarios de stress biotique ou abiotique (Batzet *et al.*, 1998; Nemoto & Sasakuma, 2002; Valderrama *et al.*, 2006).

2.1.8 Enzymes étudiées

2.1.8.1 La phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) chez plantes C3

La PEPC (phosphoénolpyruvate carboxylase, EC 4.1.1.31) est présente dans tous les organismes photosynthétiques, chez la plupart des cyanobactéries, dans le règne des *Archaea* et chez quelques bactéries non-photosynthétiques, à l'exception des animaux et des champignons (Chollet *et al.*, 1996; Ettema *et al.*, 2004). Localisée au cœur du métabolisme carboné, elle assure la β -carboxylation du PEP en présence de HCO₃⁻ pour produire de l'oxaloacétate (OAA) et du Pi en utilisant le Mg²⁺ comme cofacteur.

L'importance de la PEPC dans l'assimilation du CO₂ atmosphérique dans les métabolismes photosynthétiques des plantes C4 et CAM (*Crassulacean acid*) a fait l'objet d'études poussées depuis des décennies. Outre son rôle dans la photosynthèse, la PEPC peut remplir un large éventail de fonctions non photosynthétiques, particulièrement liée au fonctionnement de la voie anapérotyque (précédemment décrite) où elle assure la fourniture d'intermédiaires au cycle de Krebs lors de la biosynthèse et de l'assimilation de l'azote. L'évolution de cette enzyme chez les plantes a donné naissance à une gamme impressionnante de stratégies de contrôle visant la coordination de l'activité *in vivo* avec les exigences cellulaires.

Sur le plan évolutif, la PEPC appartient à une famille multigénique qui code pour plusieurs PTPCs (PEPCs, chez les plantes). Il faut préciser que, chez les plantes, une isoforme d'origine bactérienne, la BTPC (*Bacterial type PEPC*), témoigne de l'origine lointaine de ce gène (Sanchez & Cejudo, 2003). D'une manière générale, les gènes PTPCs codent pour des polypeptides de 105 à 110 kDa, contenant deux grands domaines consensus. Un domaine N-terminal qui conserve une sérine et un autre domaine consensus contenant une lysine. Ces domaines existent typiquement dans la classe 1, la première à avoir été identifiée et généralement présente sous forme d'homotétramères (Izui *et al.*, 2004). Les PTPCs peuvent être soit photosynthétiques, le cas des plantes C4 et CAM, ou non-photosynthétiques dans le cas des isoformes rencontrées chez les plantes C3. Toutefois, des études montrent que les gènes codant les PTPCs ont évolué d'un gène ancestral commun et montrent ainsi une grande conservation de séquence (Svensson *et al.*, 2003). En revanche, les gènes qui codent pour l'isoforme bactérienne, (BTPC) et qui permettent la synthèse d'une protéine plus grosse (environ 117-kDa), ne présentent qu'une identité de séquence peu élevée (<40%) quand ils sont alignés avec les gènes qui codent les PTPCs chez plantes vasculaires (Trachéobiontes (Sanchez & Cejudo, 2003; Igawa *et al.*, 2010). L'isoforme bactérienne présente aussi la particularité de ne pas contenir un site de phosphorylation N-terminal (sérine). De vastes études biochimiques et génétiques montrent que les isoenzymes PTPC rencontrées dans les feuilles des plantes C4 et CAM présentent des aspects catalytiques et de régulation bien adaptés à leur fonction comme principal mécanisme de fixation du CO₂ atmosphérique. Ces caractéristiques propres aux PTPC des plantes CAM et C4, permettent entre autre, de réduire la photorespiration pour améliorer l'efficacité globale de la photosynthèse et ainsi atteindre une activité photosynthétique 2 fois supérieure à celles des feuilles des plantes de type C3 (Svensson *et al.*, 2003; Hibberd & Covshoff, 2010). La régulation post-traductionnelle passe par plusieurs mécanismes qui contrôlent le niveau d'activité des PEPCs. D'une manière allostérique, elles peuvent subir une activation ou une inhibition par le glucose 6-phosphate (Glc-6-P) et le L-malate, respectivement. De la même manière, une activation peut se produire par phosphorylation du résidu sérine N-terminal par une sérine/thréonine kinase spécifique et Ca²⁺-dépendante, la PEPCKinase (PEPCK), ou une inhibition suite à une déphosphorylation par une protéine phosphatase 2A (PP2A) (Chollet *et al.*, 1996; Nimmo, 2000).

La PEPC kinase est une protéine de faible poids moléculaire (32 kD) dépourvue de ces extensions N- et C-terminales et qui ne possède pas de domaines de liaison calcique, même si elle est structurellement liée à la famille protéines kinases Ca^{2+} -dépendantes. *In vitro*, la phosphorylation de la PEPC module l'activité enzymatique en changeant sa sensibilité au L-malate. En effet, elle diminue l'inhibition de l'activité initiale [IC50] (de 50%) par le L-malate en augmentant l'activation constante du Glc-6-P (Echevarria *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 1996; Vidal & Chollet, 1997). Ceci permet une protection efficace contre le L-malate pour arriver à des taux catalytiques suffisamment élevés dans un contexte physiologique.

2.1.8.2 L'enzyme malique NADP-dépendante (NADP-ME)

L'enzyme malique NADP-dépendante (L-malate : NADP⁺ oxydoréductase décarboxylase, CE 1.1.1.40, NADP-ME) catalyse la décarboxylation oxydative du L-malate en utilisant le NADP⁺ comme coenzyme, avec la présence d'ions métalliques bivalents pour produire du pyruvate, du NADPH et du CO₂. (Edwards & Andreo, 1992; Drincovich *et al.*, 2001; Chang & Tong, 2003). Les cations les plus efficaces sont le magnésium (Mg²⁺) et le manganèse (Mn²⁺) (Edwards & Andreo, 1992). Les ME sont présentes chez les microorganismes procaryotes et eucaryotes, chez les plantes (C3, C4 et CAM), et les organismes animaux. Leurs séquences d'acides aminés sont hautement conservées chez ces différents organismes, ce qui suggère une fonction biologique très importante (Yang *et al.*, 2002). Dans le chloroplaste, le rôle le plus connu de la NADP-ME est un rôle photosynthétique ; le CO₂ rejeté après la décarboxylation du L-malate est ensuite introduit dans le cycle de Calvin par l'intermédiaire de la Rubisco. Ce processus s'opère dans le chloroplaste des cellules de la gaine périvasculaire chez les plantes en C4 ou pendant la journée dans le cytosol des plantes CAM (Edwards & Andreo, 1992). Le rôle des isoformes présentes dans les plantes C3 et les tissus non photosynthétiques des plantes C4, n'est pas complètement élucidé. Néanmoins, il est admis qu'elles jouent un rôle important dans la fourniture de squelettes carbonés et du NADPH, utilisés dans les voies de synthèses métaboliques, telles que la synthèse des acides gras, des lignines (Smith *et al.*, 1992; Eastmond *et al.*, 1997). Une partie du NADPH produite dans le cytosol semble être associée à la réponse aux stress (Schaaf *et al.*, 1995). Avec la PEPC, la ME est connue pour maintenir le pH intracellulaire en équilibrant la synthèse et la dégradation du malate (Martinoia & Rentsch, 1994). La ME participe également au mécanisme de fermeture des stomates et ainsi affecte la gestion de l'eau par les plantes (Laporte *et al.*, 2002). Chez les plantes, les ME sont codées par une petite famille multigénique dont l'expression est tissu-spécifique et varie suivant les différents stades ontogénétiques de la plante. Plusieurs travaux ont été réalisés sur *Arabidopsis thaliana* (plante C3 dicotylédone) et sur le riz (C3 plante monocotylédone). Le génome d'*A. thaliana* contient quatre gènes codant quatre isoformes fonctionnelles (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005). La ME-4 est localisée dans les plastes, alors que les trois isoformes ME-1, 2 et 3 sont cytosoliques (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005; 2009).

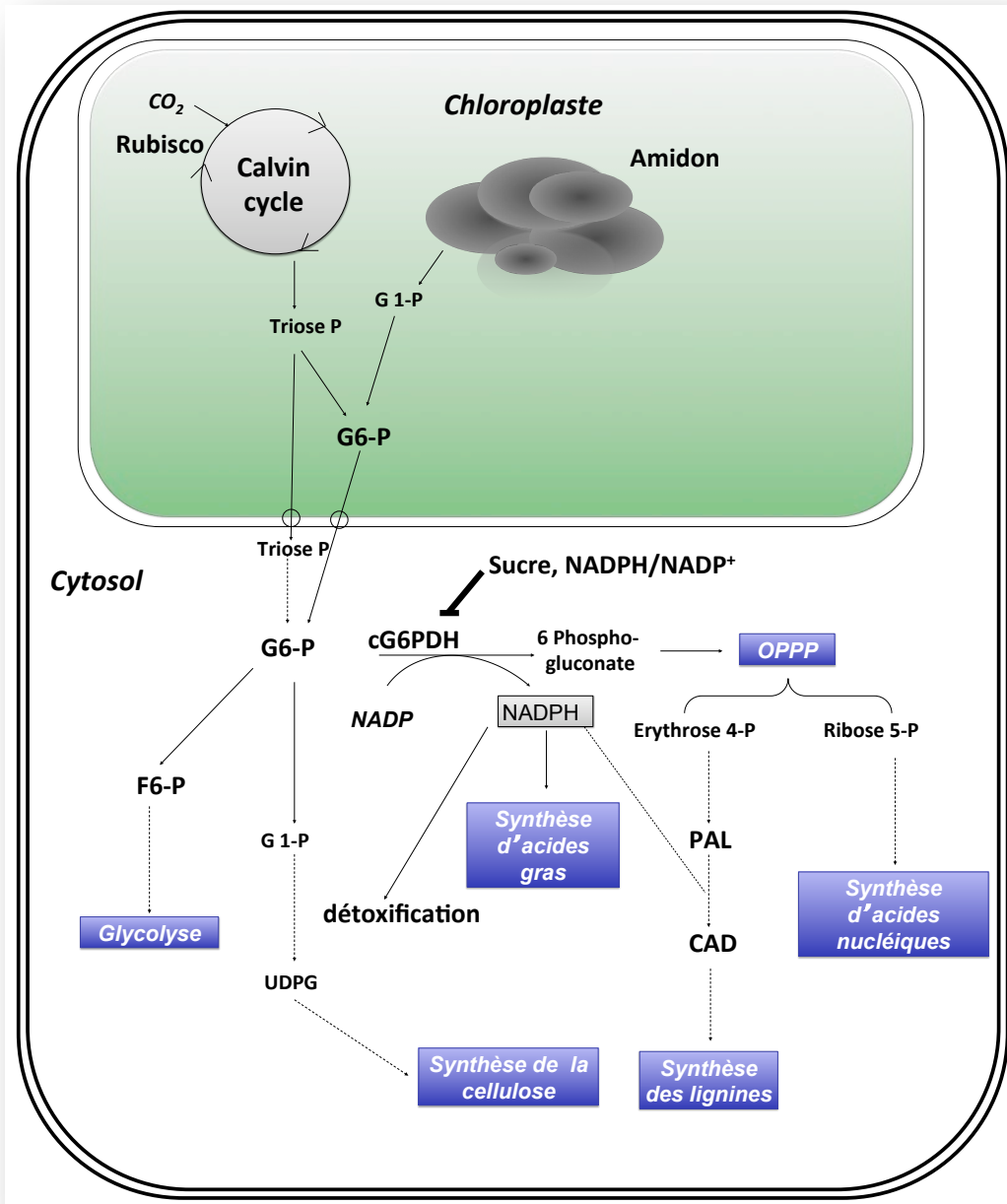


Figure 21. Schéma représentant le positionnement de la cG6PDH au sein du métabolisme carboné.

CAD, cinnamoyl alcool déshydrogénase; cG6PDH, glucose 6-phosphate déshydrogénase cytosolique NADP-dépendante ; F6-P, fructose 6-phosphate; G-1P; glucose 1-phosphate; G6-P, glucose 6-phosphate; OPPP; voie des pentoses phosphates; PAL, phénylalanine ammonia lyase; UDPG, UDP-glucose.

Bien que l'identité entre ces isoformes soit très élevée, elles diffèrent dans leurs profils d'expression et leurs propriétés biochimiques. Par exemple, l'expression des isoformes ME-2 et ME-4 semble constitutive et présente dans tous les organes. En revanche, l'isoforme ME-1 est préférentiellement exprimée dans les racines, tandis que ME-3 est exprimée dans les fleurs (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005). Les isoformes ME-1, 3 et 4 sont inhibées par l'ATP, l'oxaloacétate (OAA) et le fumarate. La ME-2 est inhibée par l'ATP et l'OAA et activée par l'aspartate, le fumarate et le succinate, tandis que d'autres isoformes ne sont pas activées par ces composés. (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005; 2008). Cette opposition entre identité génique proche et propriétés biochimiques diverses éloigne l'hypothèse de redondance fonctionnelle et suggère des fonctions biologiques spécifiques (Maurino *et al.*, 2009). Cependant, l'analyse de déficience dans une ou dans de multiples isoformes de mutants d'*A. thaliana* dans des conditions de croissance normale ne procure aucune indication de leurs probables fonctions biologiques (Gerrard Wheeler *et al.*, 2005).

2.1.8.3 **La glucose-6-phosphate déshydrogénase (cG6PDH)**

La glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH, EC 1.1.1.49) catalyse la transformation du D-glucose 6-phosphate en 6-phosphogluconate en passant par un intermédiaire instable, la 6-phosphoglucono- δ -lactone. Dans cette réaction irréversible, l'enzyme réduit spécifiquement une molécule de NADP^+ en $\text{NADPH} + \text{H}^+$. La G6PDH est présente chez tous les êtres y compris les bactéries (exception pour les Archæobactéries), procaryotes, eucaryotes, champignons ainsi que dans le règne animal (Wendt *et al.*, 1999). L'enzyme est exclusivement localisée dans le cytoplasme sauf chez les végétaux qui possèdent également une forme plastidiale (Debnam *et al.*, 2004). La G6PDH se trouve très en amont du fonctionnement de la voie des pentoses-phosphates (OPP) et participe à sa régulation en contrôlant l'entrée du G6P. À l'obscurité, l'OPP est l'une des principales sources de NADPH dans les tissus non photosynthétiques ainsi que dans les tissus photosynthétiques (Emes & Neuhaus, 1997; Thom *et al.*, 1998). En plus de la fourniture de potentiel redox, les intermédiaires de la voie OPP sont continuellement utilisés pour l'alimentation d'autres voies métaboliques. Par exemple, l'érythrose-4-phosphate, produit par le cycle de Calvin à la lumière et par l'OPP à l'obscurité, est un substrat de la voie shikimate, et aussi potentiellement un précurseur dans la voie de synthèse d'acides aminés aromatiques, de polymères de la paroi cellulaire, de phytoalexines, et de pigments (Fig. 21). Schnarrenberger *et al.* (1995) ont postulé que, dans les plantes, les réactions irréversibles de l'OPP ne peuvent pas prendre place dans le cytosol.

Cela a été récemment révisé par le travail de Eicks *et al.* (2002), qui ont caractérisé une translocation des pentoses phosphates à travers la membrane chloroplastique vers le cytosol. Ainsi, la branche oxydative de l'OPP dans le cytosol fonctionnerait étroitement avec celle qui se trouve dans les plastes. Chez *Arabidopsis*, il existe six isoformes de la NADP-G6PDH (1-2-3-4-5-6), les deux dernières isoformes ont été identifiées comme cytosoliques (Wakao & Benning, 2005). Dans le cytosol, la réaction catalysée par la cG6PDH est réglée par la balance redox représentée par le rapport NADPH/NADP⁺, plus il est élevé plus l'activité G6PDH est inhibée (Fickenscher & Scheibe, 1986). L'inactivation des G6PDHs (cytosoliques ou chloroplastiques) dans des conditions de potentiel de réduction élevé est présumée empêcher l'oxydation inutile de squelettes carbonés lorsque la production photosynthétique du NADPH est suffisante (Wakao *et al.*, 2008). La forme cytosolique est aussi fortement régulée par l'ATP, ce qui permet de contrôler l'OPP afin de fournir le cytosol en pouvoir réducteur sous forme de NADPH (Schnarrenberger *et al.*, 1973).

La forme chloroplastique, quant à elle, en plus d'être réglée par le niveau de NADPH (Lendzian & Bassham, 1975), est également sous le contrôle du rythme circadien. De jour, l'enzyme est totalement inactive. En effet, à la lumière, le flux d'électrons est capable à lui seul de réduire suffisamment de NADP⁺ pour un bon fonctionnement dans le chloroplaste (Wakao & Benning, 2005). Au sein de ce dernier, la modulation jour/nuit fait intervenir un autre médiateur, le système thiorédoxine/ferrédoxine, dont l'effet peut être mimé par le dithiothréitol (DTT) (Andersen & Høyer, 1974; Wakao & Benning, 2005). Chez les végétaux, la G6PDH a été le plus souvent décrit pour son implication dans l'assimilation d'azote dans les racines où elle permet, avec un autre complexe enzymatique, la réduction du nitrite en ammonium (Liu *et al.*, 2007).

2.1.8.4 **L'isocitrate déshydrogénase NADP dépendante (ciCDH)**

L'isocitrate déshydrogénase produit du 2-oxoglutarate à partir d'isocitrate et nécessite le NADP⁺ comme cofacteur. Chez Les plantes et chez les animaux les isocitrates déshydrogénases utilisent différents cofacteurs : le NAD (IDH) ou le NADP (ICDH). L'IDH est une enzyme du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA ou Krebs), situé uniquement dans les mitochondries des cellules eucaryotes. Les isoenzymes ICDH appartiennent à une famille multigénique, dont les membres ont été localisés dans le cytosol (ciCDH) (Gálvez *et al.*, 1996), les mitochondries (Gálvez *et al.*, 1998), les plastes (Gálvez *et al.*, 1994) et les peroxysomes (Corpas *et al.*, 1999). Leurs fonctions physiologiques sont toujours mal connues. L'isocitrate déshydrogénase cytosolique catalyse la production de 2-oxoglutarate (2OG) en utilisant l'isocitrate et le NADP⁺ comme cofacteur.

En dehors de leur rôle possible dans la synthèse d'acides aminés, de plus en plus d'études attribuent aux ciCDH un rôle important dans la fourniture du NADPH en conditions de stress (Smeets *et al.*, 2005; Hodges *et al.*, 2003; Mhamdi *et al.*, 2010b)

Deux hypothèses impliquant les isocitrates déshydrogénases de différents compartiments subcellulaires ont été décrites dans le fonctionnement de la voie glutamine synthétase /glutamate synthase (GS/GOGAT). Il a été proposé que la mitochondrie soit le siège principal de la production du 2-oxoglutarate (2OG) par l'action de l'IDH mitochondriale au niveau du cycle de Krebs. Ce 2OG serait transporté plus tard vers les plastes. Une seconde hypothèse fait intervenir l'isoforme cytosolique ICDH qui pourrait synthétiser le 2OG à partir du citrate présent dans le cytosol (Fig. 19). Dans cette voie, le citrate est transporté de la mitochondrie vers le cytosol puis ensuite transformé par l'aconitase cytosolique pour générer l'isocitrate nécessaire à la synthèse de l'2OG par la cICDH. Le 2OG, d'origine cytosolique, est ensuite importé dans les plastes (Fig. 19). Comme ICDH (ou la cICDH) représente plus de 90% de l'activité totale isocitrate déshydrogénase dans les tissus végétaux (Chen *et al.*, 1990; Mhamdi *et al.*, 2010b), elle serait la principale enzyme responsable de la production du 2-OG en direction des plastes (Pascual *et al.*, 2008). Ceci serait le cas quand de grandes quantités de glutamate sont nécessaires, par exemple au cours de la croissance où de la production de nouvelles structures exigeant un approvisionnement net en source d'azote, tels que le glutamate et la glutamine.

Contrairement aux formes bactériennes et à celles trouvées chez la levure et les animaux, l'activité cICDH des plantes n'est pas régulée par des facteurs allostériques, bien qu'elle soit bloquée par le NADPH. En revanche l'activité ICDH chez *Escherichia coli* est contrôlée par la phosphorylation réversible d'un résidu sérine, l'enzyme étant inactive lorsqu'elle est phosphorylée. Bien que les cICDHs végétales possèdent un résidu équivalent (Shorrosh & Dixon, 1992) il n'y a pas de preuve substantielle pour qu'elles soient régulées par un tel mécanisme.

Chez les plantes herbacées, la cICDH est associée au métabolisme de l'azote (Hanning & Heldt, 1993), et l'augmentation de sa régulation, ainsi que celle d'autres enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote, a été observée dans des plants de tabac avec une faible activité de la nitrate réductase (Scheible *et al.*, 1997). Chez la tomate, la cICDH est associée à l'accumulation de glutamate et d'autres dérivés d'acides aminés au cours de la maturation du fruit (Gallardo *et al.*, 1995), et possède aussi un rôle dans le recyclage et la distribution des acides aminés lors de la sénescence (Fieuw *et al.*, 1995; Masclaux *et al.*, 2000).

2.1.8.1 NADP-glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase

Trois glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénases (GADPH), capables de catalyser l'oxydation du glyceraldéhyde-3-phosphate (Ga3P), ont été isolées dans les plantes, avec des propriétés distinctes à chacune d'elles (Pupillo & Faggiani, 1979; Habenicht, 1997; Gómez Casati *et al.*, 2000).

Deux d'entre elles peuvent catalyser l'oxydation réversible du Ga3P en 1,3-bisphosphoglycérate en présence d'un orthophosphate inorganique (*Pi*) – la première NAD dépendante (CE 1.2.1.12; [cGAPC]) se trouve dans le cytoplasme des cellules photosynthétiques et non-photosynthétiques. La deuxième (EC 1.2.1.13), utilisant soit le NAD ou le NADP comme cofacteurs, est confinée dans le chloroplaste (Plaxton, 1996).

La troisième enzyme, la Ga3P déshydrogénase non-phosphorylante NADP-dépendante (EC 1.2.1.9; cGADPH), se trouve dans le cytosol. Cette enzyme catalyse la conversion du Ga3P en 3-phosphoglycérate d'une manière irréversible et permet la réduction du NADP en NADPH. La cGADPH est une enzyme tétramérique d'environ 200 kDa qui est codée par un seul gène (GAPN). L'analyse par alignement de séquences protéiques montre que la cGADPH partage seulement 20% à 30% d'identité avec la superfamille des aldéhydes déshydrogénases (Habenicht *et al.*, 1997). Chez les plantes, il a été démontré que la forme active est phosphorylée (Bustos & Iglesias, 2002). Toutefois, les modes de régulation spécifique restent à déterminer. Cette enzyme peut remplir divers rôles chez les plantes. Il a été proposé que l'enzyme puisse jouer un rôle de navette dans le transport du NADPH du chloroplaste vers le cytosol (Kelly & Gibbs, 1973). Ce NADPH peut servir à maintenir les niveaux du pouvoir réducteur cellulaire, notamment en cas de stress (Habenicht, 1997), ou être utilisé dans la synthèse des sucres (Rumpho *et al.*, 1983). Dans des situations de carence en phosphore, elle offre une solution alternative à la glycolyse, dans une voie qui implique la phosphofructokinase (PFK) (pyrophosphate inorganique dépendante (*PPi*)) et la phosphoénolpyruvate phosphatase ou la PEPC (Plaxton, 1996; Givan, 1999). Ce rôle alternatif pour la cGADPH pourrait être important pour le métabolisme carboné dans les tissus non photosynthétiques des plantes supérieures. Cependant, un rôle bien établi reste à déterminer pour cette enzyme.

3. *MATÉRIELS & MÉTHODES*

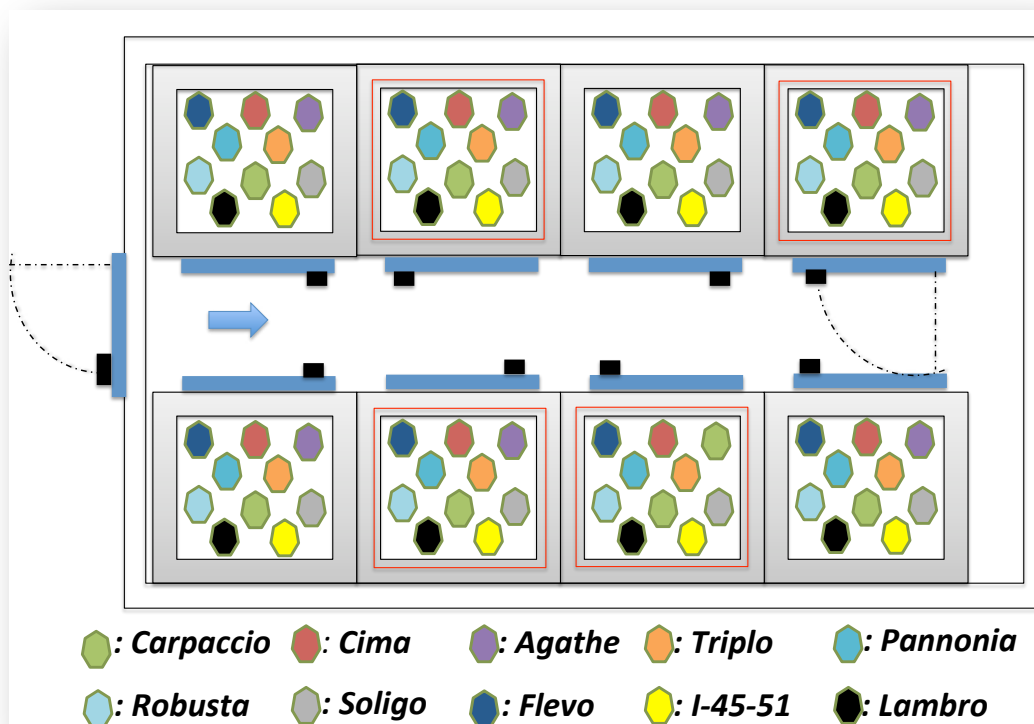


Figure 22. Représentation schématique du positionnement des plants de peupliers à l'intérieur des chambres phytotroniques lors de la première expérimentation.

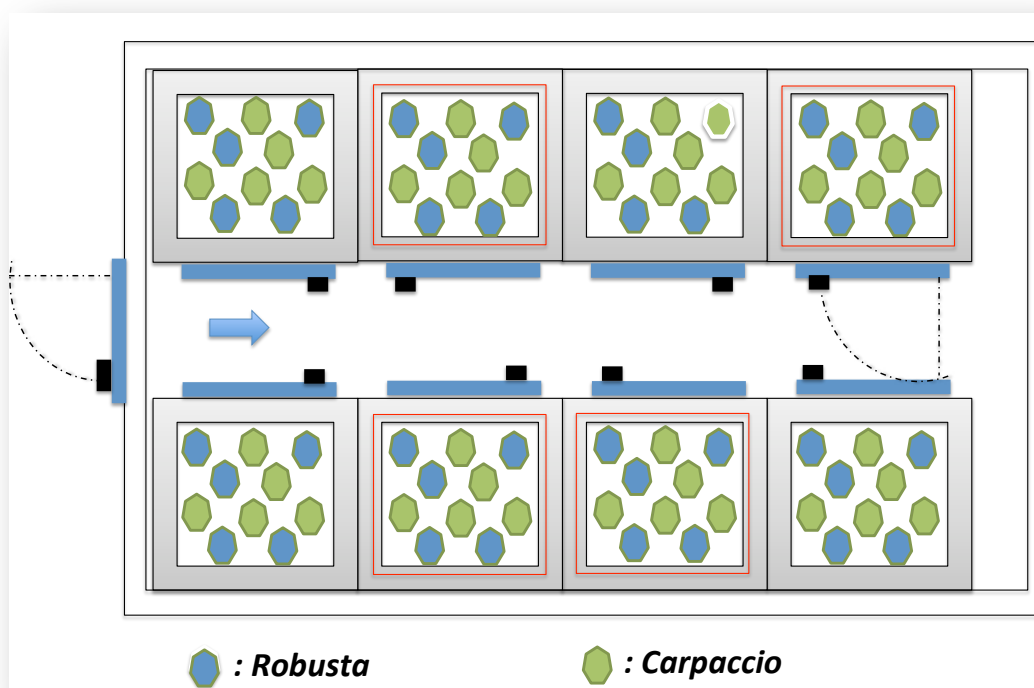


Figure 23. Représentation schématique du positionnement des plants de peuplier (génotypes *Carpaccio* et *Robusta*) lors de deuxième expérimentation.

3.1. Matériel végétal et conditions de culture

3.1.1. Chapitre n° 1

3.1.1.1. Matériel végétal utilisé

Cette étude a été échelonnée sur deux phases et menée sur le peuplier comme modèle, plus précisément sur des boutures issues de plantes mères ayant une longueur d'environ 30 cm. Une première phase consistait à sélectionner deux génotypes de peuplier parmi dix génotypes disponibles, qui puissent présenter des sensibilités différentes à l'O₃. Cette première phase, qui s'est déroulée au printemps 2009, a été menée sur les dix génotypes suivants: *Agathe* (A), *Carpaccio* (Ca), *Cima* (CI), *Flevo* (F), *I-45-51* (I), *Lambro* (L), *Pannonia* (P), *Soligo* (S), *Triplo* (T), *Robusta* (R). Tous ces génotypes appartiennent au peuplier euraméricain, hybride interspécifique issu du croisement entre *Populus deltoides* (femelle) et *Populus nigra* (mâle) (Fig. 22). La deuxième phase a été mise en place en mars 2010, sur les deux génotypes choisis, *Robusta* et *Carpaccio* dans le but de procéder à des analyses plus approfondies (Fig. 23).

3.1.1.2. Conditions de culture

Les boutures ont été plantées dans des pots plastiques de 5 L remplis d'un mélange en proportions égales de perlite et de terreau humide (Gramoflor SP1 Universel, N/P/K 14/16/18, 1,2 Kg.m³) additionné de 20 g de granulés nutritifs (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/12). Un lit d'environ 2 cm de billes d'argile expansée a été disposé au fond des pots pour améliorer le drainage. Les pots ont été placés en chambre de cultures en conditions contrôlées, avec une photopériode de 14h, une PPFd environ égale à 250 μmol.m⁻².s⁻¹, un degré d'hygrométrie de 75% ± 5% de jour et de 85% ± 5% de nuit et une température de 22°C ± 2°C jour et 18°C ± 2°C de nuit. Lorsque les plants atteignent une hauteur d'au moins 45 cm, les arbres sont transférés dans 8 chambres phytotroniques, climatisées de 2,88 m³ (1,2 m de côté pour une hauteur de 2 m). Le système comporte 4 chambres contrôles et 4 chambres pour les traitements à l'O₃.

3.1.2. Chapitre n° 2

3.1.2.1. Matériel végétal utilisé

L'étude a été menée sur des plantes matures de 3 différents génotypes, dont 2 mutants d'*Arabidopsis thaliana*, de façon à ce que le traitement ozone ait lieu avant le développement de la hampe florale. Les graines des mutants homozygotes ont été sélectionnées par nos partenaires de l'Institut de Biologie des Plantes - UMR 8618 « Oxidative and Metabolic Signaling » dont le responsable est le Pr. Graham Noctor.

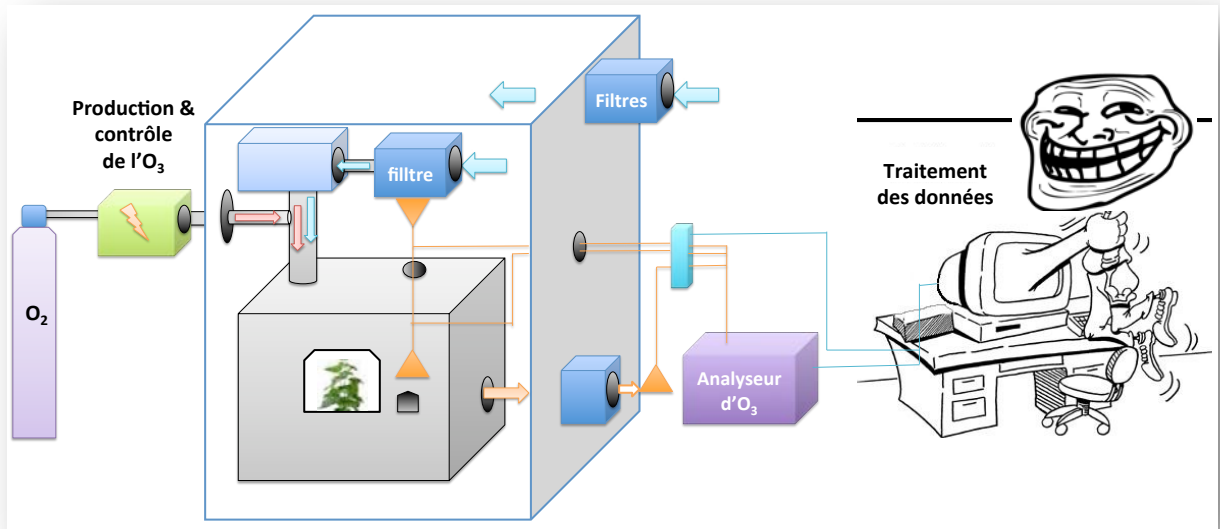


Figure 24. Représentation schématique du dispositif de fumigation.

D'après le travail de thèse de Bagard 2008

Le mutant *icdh1* : mutant ADN-t obtenu à partir de la collection SALK (SALK_056247) déficient pour le gène codant l'unique isoforme cytosolique de l'isocitrate déshydrogénase NADP-dépendante (iCDH) (Mhamdi *et al.*, 2010b).

Les lignés homozygotes ont été identifiées par PCR (30 s à 94°C, 30 s à 60°C, 1 min à 72°C, 30 cycles) utilisant les amorces spécifiques suivantes :

sens *icdh-1*; 5'-GCTATGGCAATGTACAACACTGATGA-3'

rev *icdh-1*; 5'-GAACAGATGTCATCAATCCAAGTG-3'

Le mutant *gr1* : mutant ADN-t obtenu à partir de la collection SALK (SALK_060425) pour le gène codant l'unique isoforme cytosolique de la glutathion réductase (Mhamdi *et al.*, 2010a). Les lignés homozygotes ont été identifiées par PCR (30 s à 94°C, 30 s à 60°C, 1 min à 72°C, 30 cycles) en utilisant les amorces spécifiques suivantes :

sens *gr-1*; 5'-CCCAGAGGTACCTCTTCTTCTCCCATG-3'

rev *gr-1*; 5'-TCCCCTGCATACAAAGAATGATCATTGCTAG-3'

3.1.2.2. Conditions de culture

Les graines de l'écotype sauvage Col-0, ainsi que celles des mutants homozygotes ont été incubées pendant 4 jours à 4 °C dans des pots de 7 cm contenant un support composé en proportions égales de perlite et de vermiculite. Les plantes ont été placées dans une chambre de croissance en conditions contrôlées avec une photopériode spécifique (comme expliqué ci-dessous), sous un PPFD de 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ au niveau des feuilles, 20°C/18°C (jour, nuit), humidité 65%. Les plants ont été ensuite transplantés par 3 dans des pots de 7 cm contenant un support en proportions égales de perlite et de terreau humide optimisé (N/P/K, 14/16/18, 1,2 kg.m^{-3} , Gramoflor SP1 Universel). La fertilisation était assurée par l'addition de 6 à 7 g de granules nutritives à libération lente (T Nutricote -100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil, Boulogne-Billancourt, France). Lorsque les plantes ont atteint la maturité, elles ont été transférées dans des chambres phytotroniques pour l'exposition à l'O₃.

Pour étudier l'impact de la longueur du jour, deux expériences ont été réalisées utilisant deux photopériodes différentes :

- **Photopériode courte** : La première expérience s'est déroulée pendant les mois de mars-avril 2011 et impliquait une photopériode courte de 8h jour/16h obscurité. Avant l'exposition à l'O₃, les plantes matures étaient âgées de 5 semaines.

- **Photopériode longue** : pendant la deuxième expérimentation (juin-juillet 2011), l'automate de la chambre de culture et celui des chambres phytotroniques ont été réglés de manière à avoir une photopériode de 16h avec des nuits de 8h. Une période de croissance de 3 semaines a été suffisante pour avoir des plantes matures juste avant les fumigations.

3.1.3. Chapitre n° 3

3.1.3.1. Matériel végétal utilisé

Pour ce chapitre, l'étude a été menée sur l'écotype sauvage Col-0 et sur des mutants homozygote *rcd1*. Les graines de ce mutant ont été fournies par le Pr. Kangasjärvi, J. Département de Biosciences, Université de Helsinki, Finland (<http://www.helsinki.fi/university/index.html>).

Le mutant *rcd1-1* : mutant obtenu à partir de la collection ABRC (CS9354) pour le gène codant l'isoforme RCD1, où la substitution d'un nucléotide dans le domaine PARP (poly ADP-ribose polymérase) induit la formation d'un codon stop qui conduit à interruption de la traduction et donc à une protéine tronquée (Overmyeret *al.*, 2000).

3.1.3.2. Conditions de culture

Comme mentionné dans le chapitre n° 2, pour induire leur germination, les graines utilisées dans cette expérimentation ont été incubées pendant 4 jours à 4°C dans des pots de 7 cm contenant un support de perlite et de vermiculite en proportions égales. Les plantes ont été placées dans une chambre de croissance sous des conditions contrôlées avec une héméropériode de 12h, sous une irradiation de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ au niveau des feuilles, 20°C/18°C (jour, nuit), humidité 65%. Les plants ont été ensuite transplantés individuellement dans des pots de 3 cm contenant un support en proportions égales de perlite et de terreau humide optimisé (N/P K, 14/16/18, 1,2 kg m⁻³, Gramoflor SP1 Universel) et fertilisés au moyen du même élément nutritif utilisé en chapitre n° 1 et 2 avec des proportions adaptées à la quantité du terreau.

3.2. Fumigation à l'ozone

3.2.1. Description du dispositif

La production de l'O₃ se réalise au moyen de deux générateurs (OZ500 Fischer, Bonn, Allemagne, et CMG3-3 Innovatec II, Rheinbach, Allemagne) qui sont alimentés constamment par des bouteilles d'O₂ pure. Au sein de ces deux générateurs, la formation d'une molécule d'O₃ se réalise après dissociation des molécules d'O₂ par génération d'arcs électriques. Les atomes d'oxygène qui en sont issus se réassocient à des molécules d'O₂ formant des molécules d'O₃.

Avant d'être injecté dans le circuit de ventilation des chambres de fumigation, les niveaux d'O₃ sont régulés par des débitmètres. Le dispositif dans son ensemble est équipé de plusieurs sondes de mesure reliées à un analyseur UV (O341M, Environment S.A., Paris, France) associé lui-même à une station d'acquisition informatique. Ce dispositif permet le contrôle des concentrations d'O₃, depuis son entrée dans l'enceinte phytotronique et à l'intérieur des chambres de fumigation, jusqu'à son rejet dans l'atmosphère après filtration. Les chambres de fumigation sont des enceintes hermétiques de 2,88 m³, contrôlées et constamment ventilées. Cinq lampes à vapeur de sodium (Son-T Agro, Philips, Eindhoven, Pays-Bas) assurent l'éclairage, dont la durée est contrôlée par un automate. En ce qui concerne l'intensité de la lumière, elle peut être modulée soit en jouant sur la proximité des plantes par rapport aux lampes, soit par le nombre de lampes mises sous tension. Un luxmètre portatif (testo540, Sparta, NJ, USA) permet l'acquisition de l'intensité de la lumière à la hauteur des feuilles. La température et le degré d'hygrométrie sont contrôlés également par des automates reliés aux systèmes informatiques qui, au moyen de sondes, affichent leurs valeurs dans chaque chambre deux fois par heure (en même temps que celles des concentrations en O₃). L'air atmosphérique qui alimente les chambres est filtré à l'aide de filtres à charbon actif, afin de limiter les concentrations d'O₃ dans les chambres témoins à 10 ppb. Dans un souci de contrôle en matière de réglementation sur les polluants, l'O₃ qui se trouve à la fin du circuit de ventilation est neutralisé (même type de filtres) avant d'être rejeté dans l'atmosphère (Fig. 24).

3.2.2. Fumigations et échantillonnages

3.2.2.1. Chapitre n°1

3.2.2.1.1. Première phase : choix des génotypes de peupliers par leur réponse à l'O₃

Deux mois séparent la mise en culture des boutures et le début des fumigations. À la fin de cette période, 80 arbres (8 arbres pour chaque génotype) ont été répartis dans les 8 chambres de manière à former un échantillon homogène et à avoir 4 répétitions pour chaque génotype (contrôles et traitement) (Fig. 22). Les conditions dans les chambres de fumigations étaient identiques à celles utilisées en chambre de culture.

L'exposition à l'O₃ commence une heure après le début de l'héméropériode (13h), un délai suffisant pour permettre l'ouverture des stomates. Il est important de noter qu'il faut une demi-heure pour que les chambres arrivent à saturation et qu'à la fin de la fumigation, il faut une dizaine de minutes pour que la concentration en O₃ atteigne des niveaux atmosphériques. Les plantes ont été exposées à 120 ppb d'O₃ par jour pour une durée totale de 21 jours.

Tout au long du traitement, un ensemble de paramètres a été suivi :

- **La vitesse de croissance** : c' est la différence entre la taille initiale du clone (hauteur entre le point de démarrage de la bouture et le bourgeon situé à l'apex du plant) à T_0 , le premier jour de fumigation, et la taille finale après une semaine. Trois mesures sont effectuées pour le témoin et pour le traitement O_3 , à raison d'une mesure par semaine.
- **Le pourcentage de feuilles tombées sous l'effet de l'ozone** : c'est le nombre de feuilles tombées par rapport au nombre total de feuilles (calculé à la fin du traitement).
- **Suivi des symptômes visibles** : la cinétique d'apparition des nécroses a permis d'apprécier et de comparer les effets visibles du traitement O_3 sur les différents cultivars.
- **Mesure des échanges gazeux foliaires** : la conductance stomatique (g_s , mol H_2O $m^{-2}s^{-1}$) et l'assimilation nette (A , $\mu\text{mol CO}_2$ $m^{-2}s^{-1}$) sont mesurées toutes les semaines à l'aide d'un système portatif de mesure d'échanges gazeux LI-6200 (LiCor, Inc., Lincoln, NE, USA). Ce système permet, par le biais d'analyseurs infra-rouge (IRGA), de mesurer l'évolution des concentrations en CO_2 et en vapeur d'eau de la feuille, ou d'une partie de la feuille, dont la surface est calculée à chaque mesure. La chambre portative de l'appareil (4 L, transparente et étanche) permet les mesures sur des feuilles matures (FM), 8^{ème}- 10^{ème} feuilles à partir de l'apex, qui sont marquées à T_0 par un ruban (bleu, Fig. 25).

3.2.2.1.2. Deuxième phase : géotypes choisis

Plus de 40 boutures de chacun des 2 géotypes sélectionnés (*Carpaccio*, *Robusta*) ont été mises en culture. Au bout de la période de culture (2 mois), les arbres ont été repartis d'une manière homogène, et en nombre égal, dans les chambres phytotroniques (Fig. 23). Les fumigations se sont déroulées de manière identique à la première phase (120 ppb, 13h), pour une période de 17 jours. En plus des paramètres pourcentage des feuilles tombées sous l'effet de l' O_3 , et étude des symptômes visibles sur les FM (ruban rouge et bleu, fig. 25) nous avons effectué les opérations suivantes :

- **Échantillonnages pour analyses biochimiques** : l'échantillonnage de FM a été réalisé 2, 4, 7, 11, 17 jours après le début de l'exposition à l' O_3 . Une feuille (6^{ème} -7^{ème}, à partir de l'apex) marquée avec un ruban rouge, (fig. 25) et une autre située sur le plateau en dessous, sont prélevées par arbre et par chambre. Les pétioles et les nervures centrales sont éliminés, le reste est collecté dans du papier aluminium puis rapidement congelé dans de l'azote liquide et immédiatement stocké à -80°C .

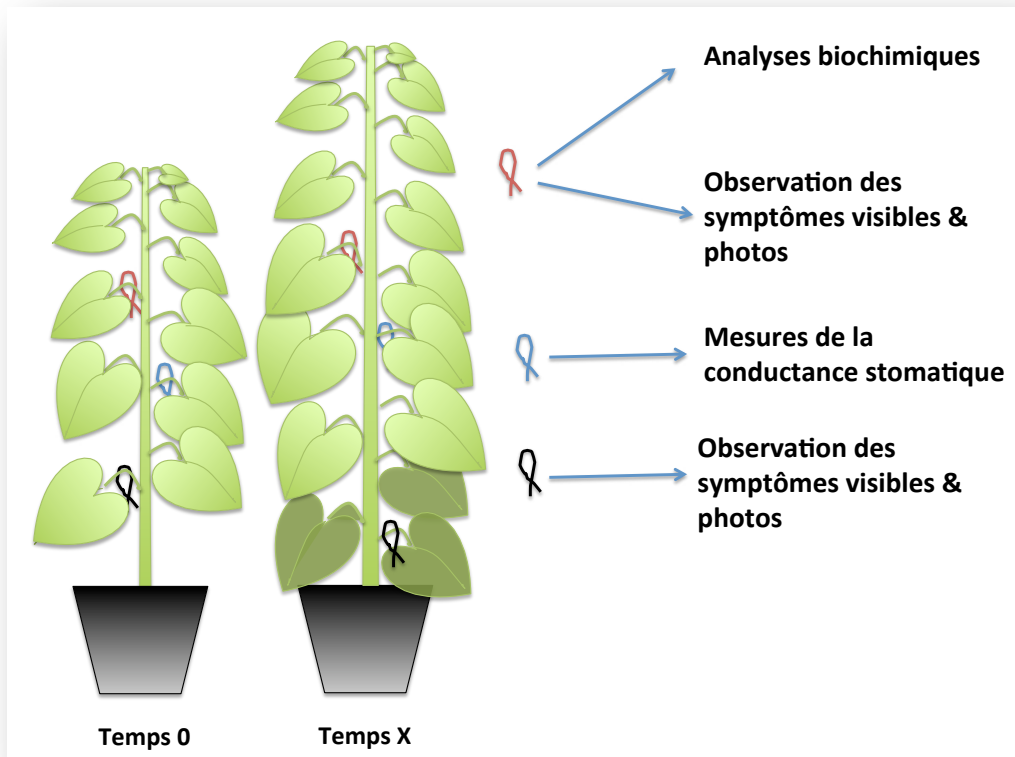


Figure 25. Représentation schématique des plants de peuplier et des feuilles échantillonnées à différentes dates de prélèvements.

Temps 0 = moment de démarrage de la fumigation ; temps X = après x jours de traitement ozone (dans la figure, l'arbre schématisé au temps x est comparable au plant contrôle observé en fin de période de fumigation).

- **Mesure et calcul de la teneur en chlorophylles totales** : cinq mesures ont été effectuées les jours 4, 11, 15, 17, 18 après le début de la fumigation au moyen d'un chlorophylle-mètre CCM-200 (Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). Deux à trois mesures sont réalisées par feuille (ruban rouge, fig. 25) et par arbre échantillonné. L'appareil en question mesure un indice appelé CCI (*chlorophyll content index*) correspondant à la teneur foliaire en pigments chlorophylliens. La concentration en chlorophylle déterminée par une méthode biochimique destructive peut être également calculée par la relation linéaire suivante, la liant au CCI (Bagard *et al.*, 2008) :

$$[\text{Chl}] = 0,0214(\text{CCI})$$

- **Indice d'exposition à l'ozone** : la dose phytotoxique de l'ozone (POD, *phytotoxic ozone dose*) est déterminée à partir des concentrations horaires en ozone et des mesures de conductance stomatique (g_s) des FM (ruban bleu, fig. 25). Comme la diffusion de l'ozone à travers la cuticule est négligeable (Kerstiens & Lenzian 1989), le flux instantané d'ozone (FO_3) entrant dans le mésophylle correspond à :

$$FO_3 = gO_3 ([O_3]_{\text{amb}} - [O_3]_{\text{int}})$$

où :

gO_3 correspond à la conductance stomatique pour l'ozone ($\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

$[O_3]_{\text{amb}}$ correspond à la concentration d' O_3 ambiante

$[O_3]_{\text{int}}$ correspond à la concentration d' O_3 à l'intérieur du mésophylle, négligeable considérant la décomposition rapide de l' O_3 au contact de l'apoplasme (Laisk *et al.*, 1989).

Les conductances stomatiques pour la vapeur d'eau (g_s) et pour l'ozone sont reliées par une relation qui prend en considération leur diffusivité respective (Laisk *et al.*, 1989, Emberson *et al.*, 2000) :

$$gO_3 = 0,668 g_s$$

Le flux instantané d'ozone ($\text{nmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), peut donc être calculé par la formule :

$$FO_3 = 0,668 [O_3]_{\text{amb}} g_s$$

Les mesures de g_s ont été effectuées tous les 2 jours puisque les conditions à l'intérieur des chambres sont stables.

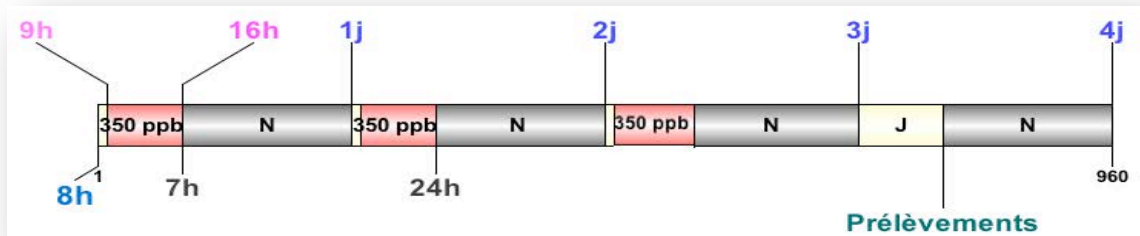
Les valeurs de g_s mesurées à un jour donné sont assignées à toutes les heures de ce jour. Pour les jours sans mesures, les valeurs moyennes horaires de g_s sont obtenues par interpolation linéaire entre les valeurs des jours précédent et suivant. Le POD_0 (mmol.m^{-2}) correspond à la somme des doses horaires sur l'ensemble de la période d'étude :

$$POD_0 = \sum_{i=1}^n \frac{3600 \cdot [O_3]_i \cdot g_{s_i}}{0,668}$$

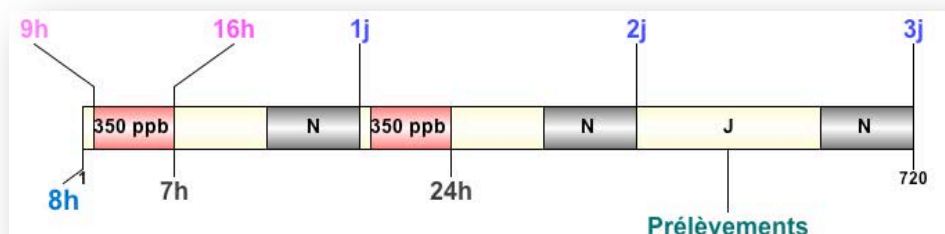
3.2.2.2. Chapitre n° 2

Placés dans les chambres phytotroniques, les plants d'*Arabidopsis* ont été exposés pendant 7h à une dose d' O_3 d'environ 350 ppb. Comme pour le peuplier, l'exposition a commencé 1h après le début de la photopériode. Le nombre de périodes de fumigation a été porté à 2 ou 3 en fonction de la durée de la photopériode. Quelque soit la photopériode, une période de récupération de 24 h a été prévue avant les prélèvements. Seule la couronne externe des plantes a été prélevée dans des sacs en aluminium qui sont plongés de suite dans de l'azote liquide, puis stockés à -80°C avant que le matériel soit broyé.

- **Photopériode courte** : pour les SD, un total de 3 fumigations a été appliqué afin d'apercevoir les premières lésions sur les feuilles des 3 génotypes utilisés :

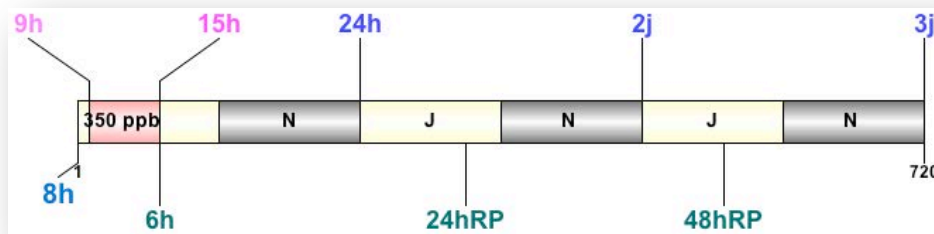


- **Photopériode longue** : pour les LD, 2 fumigations de 350 ppb ont été suffisantes pour induire des symptômes étendus sur les feuilles des différents génotypes utilisés :



3.2.2.3. Chapitre n°3

Les deux génotypes d'*Arabidopsis*, Col-0 et rcd1, ont été sujets à une seule exposition aiguë à l'O₃ de 350 ppb pour une durée de 6h. Les prélèvements consistaient uniquement en la couronne externe où les symptômes visibles sont les plus notables. Trois prélèvements ont été effectués ; un prélèvement juste après l'exposition à l'O₃, un prélèvement après une période de recouvrement (RP) de 24h et un dernier à la fin d'une RP de 48h :



3.3. Extraction et dosage des protéines solubles

3.3.1. Extraction et filtration des extraits végétaux

Environ 300 mg de poudre de matière fraîche préalablement broyée dans l'azote liquide sont ajoutés à du PVPP (polyvinylpyrrolidone) 10 % m/m, puis mixés à l'aide d'un broyeur à billes (en présence de 3,5 ml de tampon d'extraction dont la composition est la suivante :

Tampon HEPES-KOH, pH 7,5, 100 mM, PVP 25 (polyvinylpyrrolidone) 6% (m/m), PEG 20 (polyéthylène glycol) 7% (m/m), DTT 2 mM, MgCl₂ 5 mM, EGTA 5 mM, Glycérol 10% (v/v) et 5% (v/v) d'une mixture d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich P9599). Les extraits sont ensuite centrifugés durant 20 min à 36 000 *g* et à 4°C (centrifugeuse Beckman Avanti 30, Rotor F-2420). Le surnageant est transféré dans des microtubes préalablement refroidis et temporairement stockés dans la glace pour être filtré.

L'étape de filtration permet le dessalage et la purification des extraits bruts obtenus après la centrifugation. Pour cela, un volume de 2,5 ml d'extraits est passé à travers des colonnes Sephadex G25 (Pharmacia PD-10, Orsay, France) puis, suivant les instructions du fabricant, élué avec un volume de 3,5 ml de tampon d'éluion de composition :

Tampon HEPES-KOH pH 7,5, 100 mM, DTT 2 mM, MgCl₂ 5 mM, glycérol 10% v/v.

3.3.2. Dosage des protéines solubles

Le dosage des protéines solubles a été effectué suivant le protocole décrit par Wildhagen *et al.* (2010), qui repose sur le principe de Bradford (1976) impliquant le changement d'absorbance (de 465 nm vers 595 nm)

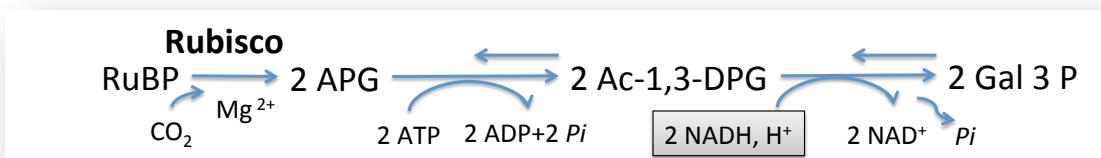
du bleu de Coomassie après sa fixation aux résidus d'acides aminés (aromatiques et acides) des polypeptides en solution. Dans une plaque de microtitration de 96 puits à spectre visible (Dominique Dutscher., Brumath, FR), 10 µl d'extrait ont été mixés à 200 µl d'une solution diluée 4 fois de bleu de Coomassie (Bio-Rad Laboratories, Inc., FR). Après 10 min d'incubation à température ambiante, les mesures d'absorbance sont réalisées dans un lecteur de microplaques (Biotek, PowerWave™ HT, USA) à une longueur d'onde de 595 nm. Une gamme étalon (0 à 20 µg) de sérum albumine bovine (Sigma-Aldrich., Munich, Germany) est réalisée à chaque mesure. Au moins 2 répétitions sont effectuées pour chaque échantillon.

3.4. Dosages enzymatiques

Les dosages des différentes enzymes détaillées ci-dessous ont été tous effectués par spectrométrie au moyen d'un lecteur de microplaques (Biotek, PowerWave™ HT, USA). Les plaques sont constituées de 96 puits de 200 µl à spectre UV (Dominique Dutscher, Brumath, FR). Toutes les mesures d'activités, réalisées à 30°C, sont basées sur l'absorption spécifique à 340 nm du cofacteur adénylique réduit, spécifique à l'enzyme (NADH ou NADPH). Lors des dosages, la réaction est initiée par l'ajout d'un substrat spécifique à chaque enzyme dans les 2 puits réactionnels. Le puits témoin ne contient pas de substrat.

3.4.1. Rubisco, activité carboxylase totale (EC 4.1.1.39)

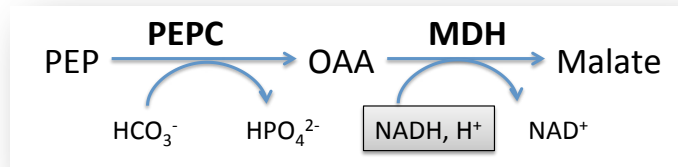
La mesure *in vitro* de l'activité Rubisco consiste à mesurer le NADH oxydé lors de la série de réactions couplées suivant le mécanisme réactionnel suivant :



Le milieu réactionnel utilisé possède la composition décrite par Fontaine *et al.* (1999) : Bicine-KOH pH 8 100 mM, ATP 3,5 mM, NaHCO₃ 25 mM, NADH 0,25 mM, CP (Créatine-phosphate) 5 mM, CPK (créatine phosphate kinase) 5 U.mL⁻¹, MgCl₂ 20 mM, GAPDH 5 U.mL⁻¹, 3-PGK (3-Phosphoglycérate kinase) 5 U.mL⁻¹. Aux 195 µl de milieu réactionnel, on ajoute 5 µl d'extraits végétaux afin de déterminer l'activité totale. Après mélange, le tout est incubé pendant 15 min à 30°C à l'intérieur du lecteur de microplaques préalablement programmé pour cette étape. L'incubation permet d'atteindre la température optimale nécessaire à l'activation de la Rubisco, dont la réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout du RuBP à 0,5 mM. Le programme fourni avec le lecteur de microplaques peut être paramétré pour obtenir directement les pentes des droites qui permettent le calcul de l'activité.

3.4.2. Phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31)

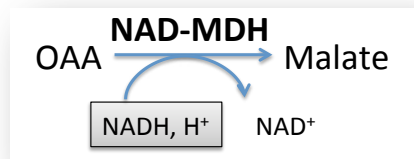
Pour déterminer l'activité PEPC, une réaction couplée à la malate déhydrogénase (MDH) commerciale (EC 1.1.1.37, M2634 Sigma -Aldrich) est nécessaire :



Le milieu de dosage utilise la composition recommandée par Fontaine *et al.* (2003) :

Tris-HCl pH 8 112,5 mM, MgCl_2 5 mM, NaHCO_3 5 mM, NADH 0,2 mM, G6P 2 mM, MDH 3 U.mL⁻¹. La réaction est déclenchée par ajout de PEP 4 mM au mélange extrait brut (20 à 30 μl) + milieu de dosage (170 à 180 μl) et l'activité de l'enzyme est suivie durant 25 min à 30°C.

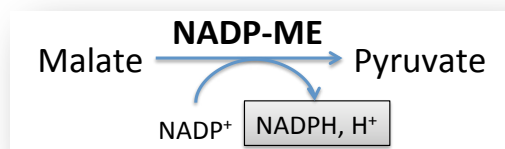
3.4.3. Malate déshydrogénase à NAD (NAD-MDH EC 1.1.1.37)



Le dosage de de l'activité MDH à NAD (enzyme commerciale; chapitre 3) a été entrepris dans un milieu réactionnel impliquant le même tampon que celui utilisé pour la PEPC, :

Tris-HCl pH 8 112,5 mM, NADH 0,3 mM, EDTA 1 mM, MDH 3 U.mL⁻¹. La réaction a été initiée par l'addition de OAA à 1mM.

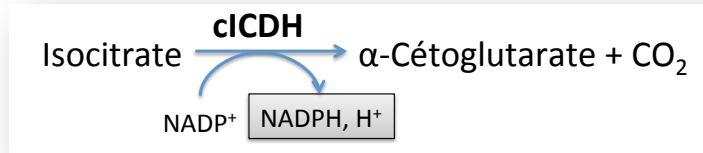
3.4.4. Enzyme malique à NADP (NADP-ME, EC 1.1.1.40)



Le milieu réactionnel utilisé, adapté des travaux de Casati *et al.* (1997), est le suivant :

Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NADP 0,5 mM, malate 10mM. La réaction est initiée par l'ajout de MnCl₂ 10 mM. Le témoin est réalisé par le remplacement du MnCl₂ par l'EDTA 14 mM.

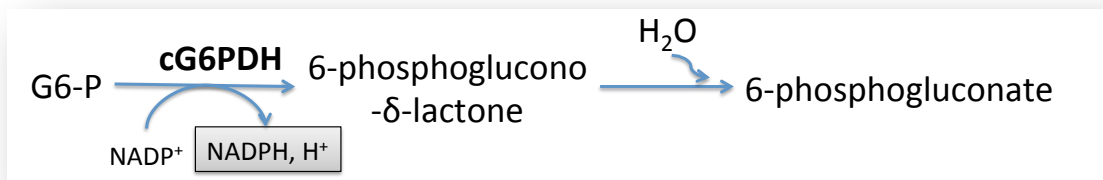
3.4.5. Isocitrate déshydrogénase cytosolique à NADP (cICDH, EC 1.1.1.42)



La composition du milieu réactionnel est adaptée des travaux de Gupta & Singh (1988) :

HEPES-KOH pH 8,3 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NADP 0,5 mM. La réaction est déclenchée par l'addition d'isocitrate à 0,5 mM. Le témoin ne contient pas d'isocitrate.

3.4.6. Glucose 6-phosphate déshydrogénase (cG6PDH, EC 1.1.1.49)

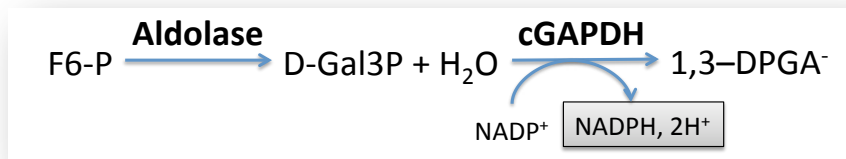


Le dosage enzymatique s'est déroulé suivant les conditions décrites par Pitel & Cheliak (1986) qui utilise un pH optimisé pour l'isoforme cytosolique :

HEPES-KOH pH 7,6 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NADP 0,3 mM. La réaction est déclenchée par l'addition du glucose-6-phosphate (G6-P) à 0,5 mM, le témoin ne contenant pas de G6-P.

3.4.7. Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylante NADP-dépendante (CE 1.2.1.9; cGAPDH)

Pour déterminer l'activité de cette enzyme, une réaction couplée à l'aldolase commerciale (Rabbit muscle, A2714 Sigma -Aldrich) est nécessaire pour fournir le glycéraldéhyde-3-phosphate, substrat de la cGAPDH, suivant le schéma réactionnel suivant :



Le milieu réactionnel est adapté de celui conçu par Casati *et al.* (2000) contenant :

Trici-NaOH pH 8,5 50 mM, 0,11 mM NADP, aldolase 2 U.mL⁻¹, 2,4 mM fructose-1,6-bisphosphate (F6-P). La réaction a été initiée après l'ajout du F6-P. Les puits témoins ne contenaient pas de F6-P.

3.4.8. Expression des résultats

Les activités enzymatiques présentées dans ce travail sont exprimées en nanokatal par mg de protéines (nkat. mg⁻¹ prot). Un nanokatal correspond à une nanomole de substrat transformé ou de produit formé en une seconde (nmol.s⁻¹)

La loi de Beer-Lambert qui permet de calculer une activité enzymatique spécifique, donne la relation entre la variation d'absorbance au cours du temps et la concentration du produit qui est à l'origine du changement de la densité optique. La relation est la suivante :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

où :

A est l'absorbance.

ε est le coefficient d'extinction molaire du composé qui absorbe, dans notre cas le NADH ou le NADPH et qui est égal à 0,00622 cm⁻¹ nM⁻¹.

C correspond à la concentration du produit formé ou du substrat consommé.

l est la largeur de la cuve qui est de 1 cm pour cette relation. Une fonction intégrée dans le spectrophotomètre permet de prendre en compte un facteur **F** qui transforme les résultats obtenus pour les puits de la plaque en équivalent obtenu pour une cuve de 1 cm

Si cette loi prend en compte l'évolution du milieu réactionnel pendant une minute, elle peut s'écrire de la manière suivante :

$$\frac{\Delta DO}{\text{min}} \cdot F = \epsilon \cdot l \cdot \frac{\Delta C}{\text{min}}$$

ou encore

$$\frac{\Delta C}{\text{min}} = F \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot l} \cdot \frac{\Delta DO}{\text{min}}$$

$$\text{nanokatal (nmol. s}^{-1}\text{)} = F \cdot \frac{\Delta DO}{\text{min}} \cdot \frac{1}{\varepsilon \cdot l} \cdot \frac{1}{60} = F \cdot 2,68 \cdot \frac{\Delta DO}{\text{min}}$$

nmol.min⁻¹

nmol.s⁻¹

3.5. Prédiction des cystéines S-nitrosylées avec GPS-NO 0.1

Le GPS-NO 0.1 est un logiciel développé par une équipe de trois laboratoires d'universités chinoises sur la base d'un algorithme amélioré qu'ils ont baptisé « GPS 3.0 ». Ce logiciel, simple d'usage, permet la prédiction, dans des conditions de « seuil bas », des résidus cystéines (Cys) susceptibles de subir une S-nitrosylation et ceci avec une précision de 75,80%, une sensibilité de 53,57% et une spécificité de 80,14%. L'approbation de l'algorithme a passé par une validation croisée leave-one-out (LOO). L'application du GPS-SNO 1.0 a permis de recueillir plus de 485 protéines potentiellement S-nitrosylées chez les végétaux et les animaux. Ces résultats de prédiction pourraient être très utiles pour des vérifications expérimentales ultérieures qui seraient à la fois moins coûteuses et plus rapides. Le *package* implémenté dans JAVA 1.4.2, comportant le logiciel, est disponible en ligne gratuitement (<http://sno.biocuckoo.org/>).

3.5.1. Principe des prédictions et algorithme

Afin de constituer une base de données, des séquences d'acides aminés contenant exclusivement des résidus Cys S-nitrosylées, vérifiés expérimentalement, ont été collectées par l'équipe à partir de trois sources différentes; 504 séquences appartenant à 363 protéines sur PubMed, 22 contenues dans 18 protéines sur UniProt et 50 autres vérifiées dans une autre étude (Liet *al.*, 2009)

L'ensemble a été intégré dans le programme où l'algorithme compare les séquences entourant les Cys des protéines candidates avec la base de données des séquences dites positives et leurs attribue un score.

Pour différentes utilisations, les auteurs ont défini trois seuils de base qui déterminent la performance des prédictions:

| Seuil | Précision | Sensibilité | Spécificité |
|---------------|-----------|-------------|-------------|
| élevé | 80.40% | 25.20% | 91.17% |
| Moyen | 78.33% | 35.32% | 86.72% |
| Faible | 75.80% | 53.57% | 80.14% |

Un seuil élevé est défini pour des prédictions à grande échelle avec des performances satisfaisantes. Le seuil moyen réduit la rigueur du seuil élevé et est plus utile pour des prédictions à petite échelle. Le seuil faible, réduit significativement la spécificité et permet ainsi d'améliorer considérablement la sensibilité, ce qui devrait être utile pour l'identification expérimentale approfondie de tous sites potentiels de S-nitrosylation.

Dans leurs études, les auteurs ont conclu aussi, que plus ils génèrent des groupes d'appartenance mieux serait la performance. Par conséquent, le résultat a été affiné par un regroupement de type *K-means Clustering* intégré dans l'algorithme. Les Cys S-nitrosylées prédites par le logiciel, appartiendraient ainsi à l'un des trois groupes (ou clusters) A, B ou C. Au sein d'un même cluster, les sites ayant les scores de prédiction les plus élevés sont les plus susceptibles d'être S-nitrosylés.

3.5.2. Exemple

The screenshot shows the GPS-SNO 1.0 software interface. The main window displays a table of predicted sites. The table has five columns: Position, Peptide, Score, Cutoff, and Cluster. A single entry is visible at position 114 with the peptide sequence VHGHTKCP EEIGAG, a score of 4,962, a cutoff of 2,454, and assigned to Cluster B.

| Position | Peptide | Score | Cutoff | Cluster |
|----------|-----------------|-------|--------|-----------|
| 114 | VHGHTKCP EEIGAG | 4,962 | 2,454 | Cluster B |

Below the table, there is a text input field for the FASTA format sequence. The sequence entered is:

```

METFLFTSEVNEGHPDKLCDQISDAVLDACLEQDPDSKVACETCTKTNMVMVFGEITTK
ATVDYEKIVRDT CRAIGFVSD DVGLDADKCKVLNIEQQSPDIAQGVHGHTKCP EEIGA
GDQGHMFGYATDEPELMPLSHVLATKLGARLTVRKNGTCAWLRPDGKTQVTVEYYNDK
GAMVPIRVHTVLISQHDVTVNDEIARDLKEHVIVKPIPEKYLDEKTIFFHLNPSGRFVI
GGPHGDAGLTGRKIIIDTYGGWGAHGGGAFSGKDPTKVDRSGAYIVRQAAKSVVANGMAR
RALVQVSYAIGVPEPLSVFVDTYETGLIPDKEILKIVKESFDFRPGMMTINLDLKRGGNG
RFLKTAAYGHFGRDDPDFTWEVVKPLKWDKPK
  
```

At the bottom, there are radio buttons for the Threshold: High, Medium (selected), Low, and All. To the right, there are buttons for Example, Clear, and Submit.

Dans cet exemple, nous avons introduit la séquence d'acides aminés de l'enzyme AMS1 chez *Arabidopsis thaliana*, dont la S-nitrosylation du résidu Cys en position 114 a été vérifiée expérimentalement. Cette modification post-transcriptionnelle conduit à l'inhibition de l'enzyme, inhibition neutralisée quand l'équipe a remplacé la Cys par un résidu arginine (Lindermayr *et al.*, 2006).

Dans la boîte sortie, cette même Cys, apparaît dans la fenêtre des résultats comme le seul résultat positif de la recherche. Le score de 4,962 est un score élevé pour le cluster B.

3.6. Analyses statistiques

Une grande partie du travail statistique présenté dans cette thèse a été conduit sur le logiciel de traitement R (Team & others, 2010). Il s'agit d'un véritable langage de programmation interprété (Langage S), et non d'un cliquodrome, que l'on peut utiliser à toutes fins. R est constitué d'une batterie de logiciels capables d'installer et de manipuler les données, de conduire différents types de calculs, et de construire des graphiques (Venables & Smith, 2009). Le logiciel avec ces différentes fonctions est disponible gratuitement sur internet (<http://www.r-project.org/>).

3.6.1. Entrée de la bibliothèque R et des différentes données

Pour permettre au programme de fonctionner, un ensemble de bibliothèques de fonctions préalablement installées est nécessaire. La commande « library » permet de charger un *Pakage* de fonctions données. Par exemple, le *Pakage* « ade4 » contient les commandes nécessaires pour réaliser une analyse en composantes principales (PCA, Principal component analysis).

Avant l'entrée des données dans le logiciel, la manière avec laquelle elles sont présentées est très importante. En effet, la nature des lignes qui constituent chaque colonne dans le tableau de départ (extension .txt ou autres), c'est-à-dire lettres ou chiffres, détermine ensuite la nature de leur incrémentation dans R, les commandes « setwd » et « getwd » permettent d'accéder au dossier contenant les données, de les extraire et de les convertir en un format compréhensible par le logiciel, qui va ensuite définir la destinée de chaque variable. La commande « str » permet de visualiser les données entrées en temps réel et de les présenter, aussi, sous forme de tableau.

```
rm(list=ls())
library(car)
library(ade4)
library(nlme)
library(lattice)
library(multcomp)
windows(record=TRUE)
#setwd("G:\cle1\important analyse")
getwd()
tableau=read.table("Activités Enzymatiques .txt",header=TRUE,sep="\t")
str(tableau)
```

3.6.2. Traitement statistique

3.6.2.1. Comparaison d'échantillons

Dans ce paragraphe, nous allons revoir en détails un exemple de comparaison entre groupes de données collectées pour les différents génotypes de peupliers présentés dans le chapitre n°1.

Le script contient le programme suivant :

```
Mod<-lm(X~Y*Z,data=subset(tableau,Temps== « à définir »))
par(mfrow=c(2,2))
plot(Mod)
par(mfrow=c(1,1))-
summary(Mod)
anova(Mod)
Anova(Mod,type="III")
```

Dans le modèle (Mod), la fonction « lm » cherche à trouver une relation linéaire entre la variable à expliquer et les deux variables explicatives, traitement et clone.

La variable à expliquer (X) peut être une activité enzymatique donnée comme la PEPC par exemple, ou les concentrations du NADPH dans des extraits végétaux, qui prend des valeurs numériques. Les variables explicatives dans ce modèle sont le « traitement » (Y) et « le génotype » (Z). La variable « traitement » prend deux valeurs, plantes témoins (T) ou plantes fumigées (O). Comme l'étude a été menée sur deux génotypes, la variable « génotype » prend également deux valeurs *Carpaccio* (Ca) et *Robusta* (R).

Ce script est un modèle simplifié qui ne tient pas compte de la continuité du temps mais qui traite les données de chaque date de prélèvement chacune à part, ainsi le facteur temps prend les valeurs numériques fixes 2, 4, 7, 11, 15, 17 qui sont les jours de prélèvement dans le tableau. Nous avons donc ici défini deux facteurs principaux de la variabilité des données numériques. Pour une étude d'analyse de variances (ANOVA, ANalysis Of Variance) à 2 facteurs, le modèle de la régression linéaire s'écrit de la manière suivante :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + E_{ijk}$$

où :

le paramètre Y_{ijk} est la variable numérique à expliquer : activité PEPC, ICDH, concentration de NADPH etc.

- Le paramètre μ est un terme constant qui désigne la moyenne générale.
- Le paramètre α_i représente l'effet principal du traitement (contrôle, ozone) qui est aussi l'écart à la moyenne des moyennes de groupe pour ce facteur.
- Le paramètre β_j représente l'effet principal de l'ozone qui est aussi l'écart à la moyenne des moyennes de groupe pour ce facteur.
- Le paramètre γ_{ij} est le terme d'interaction entre les deux paramètres α_i et β_j .
- La variable E_{ijk} est un terme résiduel aléatoire $\sim N(0, \sigma^2)$ qui représente l'erreur.

Pour valider ce modèle, la commande « Plot » permet de visualiser et d'apprécier en graphique les quatre points qui définissent un modèle linéaire exact et indispensable pour la continuation de l'analyse qui sont :

- La linéarité de la relation.

- L'homoscédasticité ou l'hétéroscédasticité des résidus.
- L'indépendance des échantillons.
- La normalité, qui est l'hypothèse la moins importante car le modèle linéaire est robuste à la normalité et les résidus suivent asymptotiquement une loi normale.

Toutes ces propriétés permettent en effet d'éliminer les points de mesures aberrantes.

Sous R, la visualisation des résultats se fait par la commande « Summary ». La commande « Anova » permet en plus la sortie de la table d'analyse de la variance, elle permet aussi de détecter les différences entre les moyennes des échantillons et de donner leur valeurs de P et F respectives en fonction de chaque facteur ainsi que, par défaut, celle de leur interaction. La commande « Anova (Modèle, type="III") » est un autre moyen de présenter les résultats.

Cette ANOVA peut-être complétée par une analyse hiérarchique dite de « Tukey » dont la programmation passe par un modèle dit irréductible, utilisant un seul facteur de variation, dont la séquence est la suivante :

```
Mod.Irr<-lm(X~Z:Y-1,data=subset(tableau,Temps== ?))
summary(Mod.Irr)
N<-rep(4,4)
names(N)<-c("CaO","RO","CaT","RT")
summary(glht(Mod.Irr,linfct=contrMat(N,type="Tukey")))
```

Dans ce programme, la ligne « N<-rep (n,n) » crée une opération répétitive de comparaison d'un nombre $N = C_n^2$ grâce à la fonction « rep ». Dans notre exemple, il existe 2 facteurs qui contiennent 2 valeurs chacun, donc en tout $n=4$, les lignes de comparaison, créées par la fonction, sont donc $N = C_4^2 = 6$.

Ensuite, les éléments à comparer sont identifiés dans l'ordre de leur apparition dans le tableau puis incrémentés dans N, ici les noms sont représentatifs du génotype (Ca, R) et du traitement (O, T).

La dernière ligne du programme procède à la comparaison statistique des éléments de la matrice 2 à 2, selon les paramètres définis par le test Tukey (*Tukey's range test*) et donne les différentes valeurs de P en ajoutant à celles qui sont significatives ($P < 0.05$, $P < 0.01$ et $P < 0.001$) le nombre d'étoiles *, ** et *** respectivement. Nous procédons ensuite à leur classification hiérarchique manuellement en attribuant la lettre « a » à la valeur de moyenne la plus élevée dans le groupe de 4 moyennes comparées (en activité enzymatique par exemple). Dans un groupe de données, les moyennes possédant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes.

3.6.2.2. Comparaison des pentes de régressions

Dans ce paragraphe, nous allons revoir le programme R qui nous a permis de déterminer si, sous O_3 , les droites de régression linéaire étaient statistiquement séparées.

Ceci par les comparaisons des coefficients directeurs des relations d'activités des NADP-déshydrogénases en fonction de l'activité de la PEPC et de l'activité de la NADP-ME en fonction de l'activité cIDCH de chaque génotype.

```
Mod<-lm(X~Génotypes*X',data=subset(tableau,Traitement=="O"))
par(mfrow=c(2,2))
plot(Mod)
par(mfrow=c(1,1))
summary(Mod)
anova(Mod)
Anova(Mod,type="III")
plot(tableau$X',resid(Mod))
plot(X~X',data=subset(tableau,Traitement=="O"),#log="y",
     pch=ifelse(Traitement=="T",19,21),
     col=ifelse(Clone=="Carpaccio","black","blue"))
```

Dans le modèle linéaire de ce programme, les variables numériques à expliquer (X) (constituées de valeurs d'activités enzymatiques), sont fonctions de deux variables explicatives, les génotypes et une autre variable de nature numérique (X') (valeurs d'activités enzymatiques autres que celle de X). La détermination de l'exclusivité des valeurs à prendre en compte est déterminée par la fonction « (tableau, Traitement=="O") » qui oriente le programme vers les valeurs d'activités enzymatiques sous O₃.

Le cours des traitements se réalise comme expliqué dans le paragraphe précédent. La commande « plot (X~X',...) » permet de représenter graphiquement X en fonction de X' pour chaque génotype et de dessiner également les droites de régression pour chacune des fonctions dans la même fenêtre.

3.6.2.3. Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales est une approche à la fois géométrique et statistique qui permet la représentation des variables dans un espace selon des directions d'inertie maximale et d'axes d'indépendance qui explique au mieux la variabilité des données. Dans le cadre du chapitre n°2, cette étude a permis d'apprécier la variabilité des activités enzymatiques enregistrées chez les différents génotypes par rapport à deux axes définis par les deux paramètres, longueur de la photopériode et traitement O₃.

Pour arriver aux résultats présentés dans le chapitre n°2, nous avons construit un programme qui permet la représentation en ACP des différentes données sur les activités enzymatiques, de la manière suivante :

```
Data<-tableau[,c(6:12)]
names(Data)
Cercle de corrélation
Ata.pca<-dudi.pca(Data,scannf=TRUE)
Ata.pca$eig/sum(Ata.pca$eig)
```


Peut être écrit :

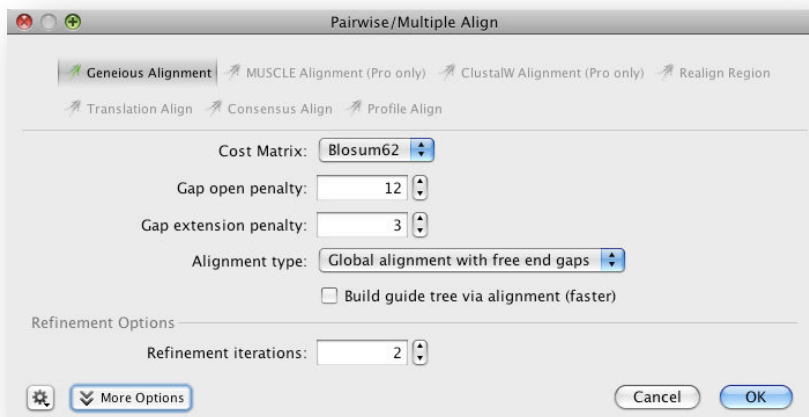
```
s.corcircle(Ata.pca$co, lab = names(Data),xax=1,yax=2,
  full = TRUE, box = TRUE)
```

ACP

```
s.class(Ata.pca$li,interaction(tableau$Genotype,tableau$Traitement,tableau$photopériode), cpoint = 1,xax
= 1,
  yax = 2)
```

3.7. Alignement de séquences

Les alignements de séquences protéiques ont été effectués à l'aide du logiciel *Geneious basic* 5.6.4 avec comme matrice de base Blosum62 (**BLOCKS** of Amino Acid **SUBstitution** **MATRIX** 62). La famille des matrices Blosum aligne plusieurs séquences d'acides aminés à la recherche de régions très conservées avec le minimum de brèches possibles. Les pénalités de défauts sur le logiciel ont été conservées pour les alignements, avec une pénalité d'ouverture de brèche de 12 et celle d'extension de 3.



**4. CHAPITRE N°1 : Capacité de régénération
du NADPH dans les feuilles de deux
génotypes de Peuplier présentant des
différences de sensibilité à l'ozone**

Table 3. Effet d'une exposition de trois semaines à une dose journalière d'ozone de 120 ppb pendant 13h sur quelques paramètres de croissance et physiologiques de dix génotypes de peuplier euraméricain.

A, *Agathe*; Ca, *Carpaccio*; Cl, *Cima*; F, *Flevo*; I, *I-45-51*; L, *Lambro*; P, *Pannonia*; S, *Soligo*; T, *Triplo*; R, *Robusta*

| | , | C, | L | R | S | F | Cl | I | P | T |
|---|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Inhibition de la Croissance de la tige | +++ | + | +++ | + | (+) | (+) | (+) | +++ | +++ | ++ |
| Feuilles tombées | 0 | +(+) | + | +++ | (+) | ++ | ++ | ++ | +++ | + |
| Nécrose | - | + | - | +++ | + | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Inhibition de l'assimilation du carbone (A) | - | ++ | ++ | + | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ |
| Effet de l'O₃ sur la conductance stomatique (g_s) | - | +++ | - | - | - | +++ | - | + | - | - |

4.1. Introduction

Les peupliers occupent une place très importante dans l'économie mondiale : environ 5 millions de mètres cubes de bois sont annuellement produits par les trembles et les peupliers baumiers dans une vaste zone circumboréale. En France, le Peuplier constitue la deuxième essence feuillue productrice de grumes. Matière première de l'industrie du déroulage, par la formation de leur bois, les plantations de peuplier constituent également un large puits de CO₂. Ces dernières décennies, l'importance de cette espèce ligneuse, tant sur un plan industriel qu'environnemental, explique l'intérêt constant que les biologistes et généticiens forestiers ont porté à cet arbre. En biologie, et suite au séquençage de son génome (520 Mb), le Peuplier (comme *A.thaliana pour les plantes herbacées*) s'est hissé au rang des organismes modèles en biochimie, physiologie et génétique forestières. Les peupliers euraméricains sont couramment utilisés dans les plantations européennes et françaises.

Le but de ce chapitre est d'étudier la réponse cellulaire de deux génotypes de Peuplier euraméricain ayant une sensibilité différente à l'ozone (O₃). Au préalable, nous avons sélectionné ces deux peupliers après un essai comparatif entre dix génotypes soumis à une exposition chronique journalière d' O₃ (120ppb) pendant 13h et l'étude de leurs réponses à travers un certain nombre d'observations et de mesure de paramètres physiologiques tels que l'inhibition de la croissance, la chute des feuilles, l'apparition des nécrose, l'assimilation de carbone et la conductance stomatique (tableau. 3). Les résultats de cette étude préliminaire ont montré une certaine hétérogénéité dans la réponse à l'O₃ des dix génotypes. Cependant, le génotype *Robusta* présentait une grande sensibilité à l'O₃ qui se traduisait par d'importantes nécroses et une chute de feuilles très prononcée (tableau. 3). A l'inverse, *Carpaccio*, retenu comme génotype tolérant a été caractérisé par une diminution très marquée de la conductance stomatique.

La poursuite de l'étude a consisté à comparer sous ozone les capacités intrinsèques de ces deux génotypes à régénérer dans le cytosol du pouvoir réducteur sous forme de NAD(P)H, susceptible d'alimenter différentes voies de détoxication. Cette investigation passe par la comparaison de différentes enzymes capables de produire du NADPH dans le cytosol ainsi que par la mesure des pools de pyridines nucléotides (NAD⁺, NADH et NADP⁺, NADPH). Le fonctionnement de ces enzymes est en étroite relation avec la disponibilité de leur substrat carboné qui semble dépendre des principales enzymes fixatrices de CO₂, en particulier la PEPC. Dans le souci de trouver une relation qui lie ces enzymes, l'activité des deux principales carboxylases des plantes C3 ont été également suivies tout le long de la période de stress.

4.2. Publication

Physiologia Plantarum

An International Journal for Plant Biology

Physiologia Plantarum 2012

Copyright © Physiologia Plantarum 2012, ISSN 0031-9317

Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in ozone sensitivity

Ata Allah Dghim^{a,b,c}, Jennifer Dumont^{a,b,c}, Marie-Paule Hasenfratz-Sauder^{a,b,c},
Pierre Dizengremel^{a,b,c}, Didier Le Thiec^{a,b,c} and Yves Jolivet^{a,b,c,*}

^aUMR1137 EEF, Université de Lorraine, F-54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France

^bUMR1137 EEF, INRA, F-54280, Champenoux, France

^cIFR110 EFABA, F-54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: jolivet@scbiol.uhp-nancy.fr

Received 13 June 2012

doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01686.x

Cell capacity for cytosolic NADPH regeneration by NADP-dehydrogenases was investigated in the leaves of two hybrid poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) genotypes in response to ozone (O₃) treatment (120 ppb for 17 days). Two genotypes with differential O₃ sensitivity were selected, based on visual symptoms and fallen leaves: *Robusta* (sensitive) and *Carpaccio* (tolerant). The estimated O₃ flux (POD₀), that entered the leaves, was similar for the two genotypes throughout the treatment. In response to that foliar O₃ flux, CO₂ assimilation was inhibited to the same extent for the two genotypes, which could be explained by a decrease in Rubisco (EC 4.1.1.39) activity. Conversely, an increase in PEPC (EC 4.1.1.31) activity was observed, together with the activation of certain cytosolic NADP-dehydrogenases above their constitutive level, i.e. NADP-G6PDH (EC 1.1.1.49), NADP-ME (malic enzyme) (EC 1.1.1.40) and NADP-ICDH (NADP-isocitrate dehydrogenase) (EC 1.1.1.42). However, the activity of non-phosphorylating NADP-GAPDH (EC 1.2.1.9) remained unchanged. From the 11th fumigation day, NADP-G6PDH and NADP-ME profiles made it possible to differentiate between the two genotypes, with a higher activity in *Carpaccio* than in *Robusta*. At the same time, *Carpaccio* was able to maintain high levels of NADPH in the cells, while NADPH levels decreased in *Robusta* O₃-treated leaves. All these results support the hypothesis that the capacity for cells to regenerate the reducing power, especially the cytosolic NADPH pool, contributes to improve tolerance to high ozone exposure.

Introduction

Ozone (O₃) is a harmful phytotoxic stressor for plants (Fuhrer et al. 1997, Matyssek and Innes 1999, Ashmore 2005, Karnosky et al. 2007, Wittig et al. 2009). It causes serious damage, including visible injury and growth decline that can lead sensitive species to death. In trees,

its harmful effect can vary with growth conditions, age, structure or the presence of other stressors (Vollenweider et al. 2003, Matyssek et al. 2004, Karnosky et al. 2005, UNECE 2005, McLaughlin et al. 2007). Poplar has been demonstrated to be among the most sensitive tree species, but its sensitivity varies depending on clones/genotypes (Karnosky et al. 1996, Yun and

Abbreviations – Chl, Chlorophyll; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ICDH, NADP-isocitrate dehydrogenase; ME, malic enzyme; ML, mature leaves; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; POD, phytotoxic ozone dose; ROS, reactive oxygen species; Rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase.

Laurence 1999, Bortier et al. 2000, Di Baccio et al. 2008, Renaut et al. 2009, Street et al. 2011). To predict the detrimental effect of O₃ on plants, several indicators of critical levels have been proposed in the last 25 years. First, SUM06 (sum of all hourly average concentrations over 0.06 ppm) or AOT40 (sum of hourly O₃ concentrations above a threshold of 40 ppb O₃ during daylight hours of the growing season) were universally used (Gothenburg Protocol 1999). However, these indicators were based on atmospheric O₃ concentration, and they were left aside in favor of flux-based indices such as POD_Y (Phytotoxic Ozone Dose above a threshold of Y nmol m⁻² s⁻¹). This new index takes into account the real O₃ flux entering the leaf through stomata (Gerosa et al. 2009), and it is based on an empirical modeling of stomatal conductance (UNECE 2004). In this concept, the threshold takes into account the intrinsic detoxifying ability of the species in question, which still remains poorly known (Baumgarten et al. 2009). As recently described, two main O₃-detoxifying barriers should be considered, and are highly variable depending on species/genotype (Dizengremel et al. 2008). The first line of defense is apoplastic ascorbate (Smirnov 1996, Plöchl et al. 2000). When that barrier is overridden by O₃ or its ROS derivatives, a second cytosolic line of defense is available within the cell. Ascorbate, glutathione, flavonoids and phenolic compounds are the main actors of the second detoxifying barrier, together with a set of ROS-scavenging enzymes (Castagna and Ranieri 2009). Symplastic ascorbate is regenerated by several cytosolic detoxifying reactions that are mainly connected to the Halliwell–Asada–Foyer cycle (Foyer and Noctor 2011), which highly depends on the presence of cytosolic NADPH (Fig. 1). Thus, its regeneration in the cytosol could be considered as a key factor for cells to face O₃-generated oxidative stress (Noctor 2006, Dizengremel et al. 2009).

The capacity for cytosolic NADPH regeneration tightly depends on enzymatic reactions linked to carbon metabolism. In fact, O₃ exposure goes along with a reduction of the Calvin cycle turn-over, starting with a decrease in Rubisco activity (Pell et al. 1992, Dizengremel 2001, Bagard et al. 2008, Dizengremel et al. 2009). A simultaneous increase in PEPC activity has been observed in several C₃ plants (Landolt et al. 1997, Dizengremel 2001, Dizengremel et al. 2009). PEPC stimulation is linked to the anaplerotic replenishment of citrate cycle intermediates, but also to higher activity of two NADPH-dependent cytosolic enzymes: NADP-malic enzyme (NADP-ME) and NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH) (Fig. 1). NADP-ME catalyzes the reversible oxidative decarboxylation of L-malate into pyruvate which leads to the release of

NADPH in the cytosol (Fig. 1). An increase in its activity has been linked to plant metabolic responses to various biotic and abiotic stresses (see Doubnerová and Ryslavá 2011 for a review) and, interestingly, to chronic and acute O₃ fumigation (Fontaine et al. 1999, Dizengremel et al. 2009, Guidi et al. 2009). NADP-ICDH catalyzes the formation of 2-oxoglutarate from isocitrate, using NADP⁺ as a cofactor. It delivers NADPH directly into the cytosol (Fig. 1). Higher NADP-ICDH activity has been linked to plant responses to oxidative stress (Møller and Rasmusson 1998, Hodges et al. 2003). NADPH produced by NADP-ICDH contributes to redox homeostasis not only in response to abiotic stress (Dizengremel 2001, Smeets et al. 2005), but also in the case of pathogen attacks (Mhamdi et al. 2010). The increase in NADP-ICDH activity can also be part of reactions involving amino acid replenishment for cell maintenance or repair processes (Dizengremel et al. 2009).

Cytosolic NADPH can also be produced by other NADP-recycling enzymes such as glucose-6-phosphate dehydrogenase (NADP-G6PDH) and non-phosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP-GAPDH) (Fig. 1). Plant NADP-G6PDH has mostly been studied for its role as an important NADPH source in fat-producing and non-photosynthetic tissues (Emes and Neuhaus 1997, Wakao et al. 2008). An increase in its activity has been measured in plants submitted to various biotic and abiotic stresses (Batz et al. 1998, Nemoto and Sasakuma 2000, Valderrama et al. 2006) particularly in response to O₃ fumigation (Dizengremel 2001, Fontaine et al. 1999, Gaucher et al. 2003). The regulation of non-phosphorylating NADP-GAPDH activity is not so well-known, but its implication in oxidative stress responses has been established (Bustos et al. 2008). Finally, when studied individually, most of these NADP-dependent enzymes were found implied in cells' capacity to increase the supply of cytosolic NADPH in response to oxidative stress. However, an integrated study to estimate the relative importance of each enzyme has not been carried out yet, especially in response to high daily O₃ doses.

The main objective of our work was to study the reducing power (NADPH) regeneration capacity of poplar leaves under ozone treatment. On the basis of the visible damage, two poplar genotypes were selected: *Robusta* (defined as O₃-sensitive) and *Carpaccio* (defined as O₃-tolerant). When we exposed the two genotypes to a high dose of 120 ppb O₃ for 17 days, they displayed similar O₃ influxes into leaves (based on POD values). So the differences in O₃ sensitivity could be attributed to a differential plasticity in leaf biochemical response. In this context, we compared the effects of O₃ treatment

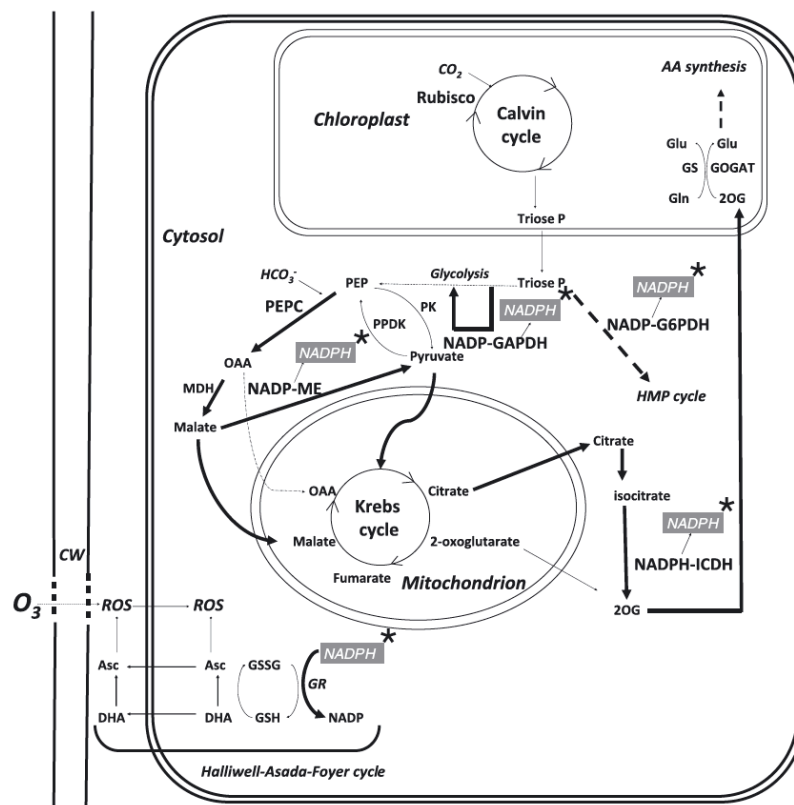


Fig. 1. Simplified scheme showing the NADP-dependent enzymes associated with cytosolic NADPH production and its use for detoxification reactions (Halliwell Asada Foyer cycle). NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH) activity is linked to oxoglutarate (2-OG) production in the cytosol, which is then imported into plastids to generate glutamate and other amino acids (AA). NADP-glucose-6-phosphate dehydrogenase (NADP-G6PDH) activity is linked to the functioning of the hexose monophosphate pathway (HMP). The substrate of the NADP-malic enzyme (NADP-ME) is malate, which can be the product of the successive reactions catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and cytosolic malate dehydrogenase (MDH). Phosphoenolpyruvate (PEP) and oxaloacetate (OAA) are respectively the substrates for these latter enzymatic reactions. NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP-GAPDH) is considered as a shunt in the glycolytic pathway which bypasses the production of NADH and ATP. Pyruvate kinase (PK) catalyzes the last step of the glycolytic pathway to produce pyruvate. Asc, ascorbate; CW, cell wall; DHA, dehydroascorbate; GSH/GSSG, reduced/oxidized glutathione; GR, glutathione reductase; PDK, pyruvate phosphate dikinase. (*) refers to the NADPH produced by cytosolic NADP-dehydrogenases.

(1) on carbon uptake by assessing net CO₂ assimilation and carboxylase activities (Rubisco and PEPC), (2) on cytosolic NADP-recycling enzymatic activities related to PEPC activity and (3) on pyridine nucleotide contents, by associating their variations to the activity levels of the NADP-dependent enzymes we assayed.

Material and methods

Growth and experimental design

Rooted cuttings of two Euramerican hybrid poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) genotypes, *Robusta* and *Carpaccio*, were transplanted to 5-l plastic pots containing optimized growth soil mixture (N/P/K 14/16/18, 1.2 kg m⁻³, Gramoflor SP1 Universel) fertilized by

adding 20 g of slow-release nutrient granules (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil, Boulogne-Billancourt, France). Drainage was improved by a 2-cm thick layer of clay balls at the bottom of the pots and 1 mg l⁻¹ of magnesium limestone was added to buffer the pH. The plants were left in growth chambers for 5 weeks. Temperature was maintained at 23°C ± 1°C (day) and 20°C ± 1°C (night) with a relative humidity of 75% ± 5% (day) and 85% (night) and with a 14-h light period (Sun T Agro, Philips, Eindhoven, The Netherlands; 250–300 μmol m⁻² s⁻¹ photon flux at leaf height). The plants were irrigated daily using tap water. During the growth period, one terminal shoot was kept. When the trees were approximately 60 cm high, selected uniform plants were transferred into phytotronic chambers for ozone exposure. In order to obtain a

statistically relevant biological replicate, 40 individuals of each genotype were distributed in eight chambers, half of which (four chambers) were set for O₃ treatment.

Fumigation and cumulative ozone uptake calculation

Phytotron chambers were constantly ventilated with charcoal-filtered air, and growth conditions were maintained identical to those in the growth chamber with 400 μmol m⁻² s⁻¹ photon flux (floor level). O₃ treatment started at the end of a 7-day long acclimation period. O₃ was produced from pure O₂ with two ozone generators (OZ500; Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) and injected directly along with the filtered air entering the chambers. Control trees were exposed to ambient O₃ concentrations (<4 ppb) throughout the treatment period. A set of automated systems and analyzers (O341M; Environment S.A., Paris, France) were used to monitor the concentrations and the length of O₃ exposure. The plants were exposed to 120 ppb ± 10 of O₃ for 13 h (09:00 to 22:00 h) daily for 17 days. Fumigation started 1 h after the beginning of the photoperiod and ran until its end. The plants were scattered and spaced daily to avoid shading. The ozone flux was estimated based on the measurement of stomatal conductance to ozone (g_{O₃}), which is related to stomatal conductance to water vapor (g_s) by the following formula: g_{O₃} = 0.668 g_s (Fares et al. 2008). g_s Measurements were performed every 2 days. For days when no measurement was performed, g_{O₃} was estimated from the adjacent values (Bagard et al. 2008). POD₀ (mmol m⁻²) was estimated by summing up hourly ozone uptakes throughout the whole experiment. In this context, our data provide indicative POD₀ estimates.

Measurement of gas exchange parameters and of total chlorophyll contents

Net CO₂ assimilation (*A*, μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) and stomatal conductance to water vapor (g_s, mol H₂O m⁻² s⁻¹) were measured using two intercalibrated portable photosynthesis Systems LI-COR 6200 (LI-COR® Inc, Lincoln, NE, USA). Measurements were only performed on the last fully expanded mature leaves (ML), corresponding to the 8th–10th leaves down from the first apical leaf. Three trees per genotype per chamber were kept from destructive sampling and only used for gas exchange. Relative chlorophyll contents (in CCI unit) were estimated using a CCM-200 (Chlorophyll Content Meter, Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). Total Chl per leaf area (g m⁻²) was determined using a known relationship established for tree leaves (Chl = 0.0214

CCI unit) as mentioned in Bagard et al. (2008). Measurements began on day 4 after fumigation started and stopped the day after fumigation ended (day 18).

Sampling procedure

Samples were taken on ML along the 17-day long exposure, on days 2, 4, 7, 11 and 17 after the beginning of fumigation. Two leaves, located next to each other, were sampled *per tree* and *per chamber*. Midribs and petioles were cut off from the foliar limb using a razor blade. Leaf samples were collected in aluminum paper, rapidly frozen in liquid nitrogen and immediately stored at –80°C.

Protein extraction and quantification

A leaf powder extract (300 mg) and 10% (w/w) polyvinylpyrrolidone were mixed with 3.5 ml of extraction buffer containing HEPES–KOH pH 7.5 (100 mM), PVP 25 6% (m/m), PEG 20 7% (m/m), MgCl₂ 5 mM, EGTA 5 mM, glycerol 10% (v/v) and 5% (v/v) protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich P9599). The crude extracts were then centrifuged at 36 000 g and at 4°C. The supernatants were filtered through Sephadex G25 columns (Pharmacia PD-10, Orsay, France) according to the manufacturer's instructions. The elution buffer contained HEPES–KOH pH 7.5, glycerol 10% (v/v), MgCl₂ 5 mM and DTT 2 mM. The eluted volume was homogenized and stored at –80°C for further analysis.

Total soluble proteins were determined according to Wildhagen et al. (2010), a protocol adapted for microplate spectrophotometry. Ten-microliter duplicates of protein extracts were pipetted into the wells of a 96-well plate and mixed with the protein assay dye (Bio-rad Laboratories, Inc., Munich, Germany). Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was used as a calibration standard.

Enzymatic activity assays

All enzymatic activities were assayed using a microplate spectrophotometer (Biotek, PowerWave™ HT, USA). Four different leaf extracts from either control or O₃-treated trees were used for each sampling date. Activities in each extract were measured in duplicates at 30°C. Only linear segments were used to calculate the maximum rates of the enzymatic reactions. Rubisco (EC 4.1.1.39) activity was determined by monitoring NADH extinction at 340 nm according to the protocol described by Fontaine et al. (1999). The reaction mixture was made of Bicine pH 8.0 (100 mM), NaHCO₃ 25 mM, NADH 0.3 mM, MgCl₂

20 mM, phosphocreatine 5 mM, ATP 5 mM, glyceraldehyde 3-phosphodehydrogenase (G3PDH, EC 1.2.1.12) 10 units ml⁻¹, 3-phosphoglycerate kinase (3 PGK, EC 2.7.2.3) 10 units ml⁻¹ and creatine phosphokinase (CPK, EC 2.7.3.2) 5 units ml⁻¹. The reaction was started by adding 1 mM ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP). A control without RuBP was prepared for each assay. The PEPC (EC 4.1.1.31) assay followed the same principle, as in Fukayama et al. (2003). The assay medium contained Tris-HCl pH 8.0 (100 mM), NaHCO₃ 5 mM, NADH 0.3 mM, MgCl₂ 20 mM, glucose 6-phosphate 2 mM, malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) 15 units ml⁻¹. The reaction was initiated by adding PEP 4 mM. A control without PEP was prepared for each assay. All the protocols used to measure cytosolic NADP-dependent enzymatic activities were based on NADPH formation at 340 nm. NADP-G6PDH (EC 1.1.1.49) activity was determined following Pitel and Cheliak (1986), who used a 50-mM HEPES buffer pH 7.6. The pH value was optimized for assaying the activity of the cytosolic isoform (the optimal pH for the chloroplastic isoform is 8.5). NADP-ME activity (EC 1.1.1.40) was determined according to Casati et al. (1997). NADP-ICDH (EC 1.1.1.42) activity was measured according to Gupta and Singh (1988). Cytosolic NADP-GAPDH (EC 1.2.1.13) activity was assayed following Bustos and Iglesias (2003).

Pyridine pool determination

The determination of NAD(H) and NADP(H) contents was based on the reduction of dichlorophenolindophenol by phenazine methosulfate, enzymatically coupled with alcohol dehydrogenase and NADP-G6PDH, respectively. According to the protocol described by Queval and Noctor (2007), slightly modified, 100 mg of leaf powder was homogenized (2 min with 2 tungsten balls, using a Retsch MM301 mixer) with 1 ml of HCl 2N (NAD⁺, NADP⁺) or 1 ml of NaOH 0.2M (NADH, NADPH). The mixture was centrifuged at 16 000 g for 10 min and the supernatant was neutralized. Absorbance-reading at 600 nm was initiated after adding 10 µl of the appropriate enzyme, in the presence of 20 µl of the assay extract and using a microplate spectrophotometer (Biotek, PowerWave™ HT, USA). Maximum rates were calculated automatically by the plate reader software and then processed using Microsoft Excel.

Statistical analysis

The data in this article are presented as means ± SE. At each sampling date, we performed a 'TYPE III' two-way analysis of variance (ANOVA), using R (R Development

Core Team, 2011), with genotype and treatment as variable factors. The data were rearranged into a linear model and differences between control and O₃ samples were considered significant if $P < 0.05$. To compare the inter-group means, the ANOVA test was followed by a significant ($P < 0.05$) Tukey range test. Linear regression was used to test the correlations between different enzymatic activity data, and was followed by a two-way ANOVA to compare r^2 . Using a linear logarithmic model in R, no statistically significant chamber effect was found for any of the tested parameters throughout the whole fumigation period.

Results

Visible injury and leaf fall

The ozone fluxes cumulated via plant stomata in the absence of a threshold value (POD₀) were calculated for *Carpaccio* and *Robusta*. They were averaged using the values obtained in the four O₃ phytotron chambers. Throughout the whole fumigation period, we observed a continuous increase in POD₀ which differed little between the two genotypes (Fig. 2). Even though ozone flux levels were similar, the two genotypes showed differences in the occurrence and the aspect of leaf injuries due to O₃ treatment (120 ppb). For *Robusta*, damage rapidly spread onto the first fully expanded leaves located at the bottom of the trees, and resulted in severe, large mottle necrosis on large surfaces (Fig. 3D). The last fully expanded leaves (ML) of this genotype displayed the same type of injury, but to a lesser extent (Fig. 3B), with brown flecks near the edges in some cases. For *Carpaccio*, the first symptoms also occurred on the first fully expanded leaves and started with chlorotic flecks on the total leaf areas, resulting in moderate internal brownish stippling (Fig. 3C). At the end of the O₃ treatment, some ML also exhibited rare, small, brown stippling on their upper surface (Fig. 3A). Due to O₃

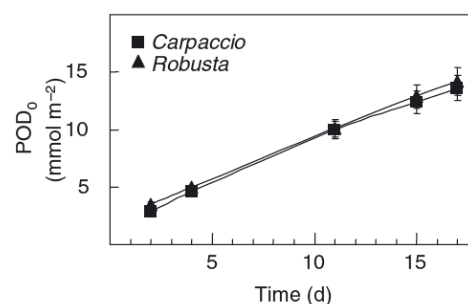


Fig. 2. Time course of POD₀ values during O₃ fumigation in *Carpaccio* and *Robusta* genotypes. Values represent means of $n=20 \pm SE$, and represent the average POD₀ values obtained in four O₃ chambers.

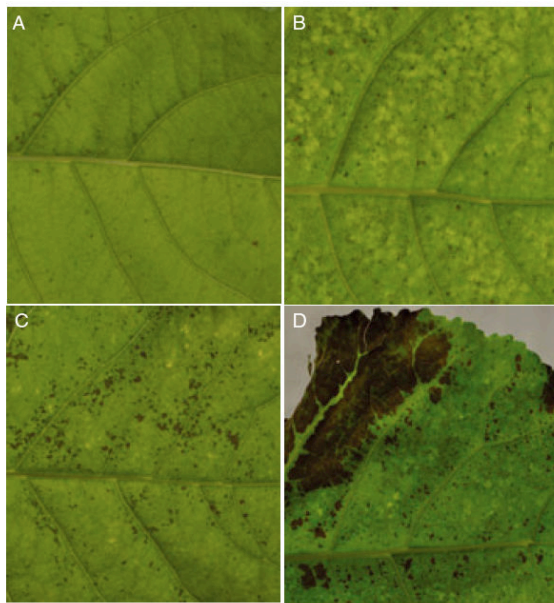


Fig. 3. Comparison of ozone-induced leaf injury observed on the last fully-expanded leaves (A, B) and the first fully expanded leaves (C, D) of *Carpaccio* (A, C) and *Robusta* (B, D) genotypes. Both genotypes were exposed to a dose of 120 ppb O₃ for 17 days.

Table 1. Percentages of fallen leaves during ozone treatment, calculated in relation to total numbers of *Carpaccio* (C) and *Robusta* (R) leaves. Values $n=4 \pm SE$ (Significant differences between O₃-exposed and control extracts are indicated by *** ($P < 0.001$)).

| Day | C-O ₃ | R-O ₃ |
|-----|------------------|------------------|
| 2 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 |
| 11 | 8.5 ± 4.2*** | 20.9 ± 0.8*** |
| 15 | 20.3 ± 8.6*** | 36.6 ± 3.9*** |
| 17 | 27.2 ± 6.3*** | 37.3 ± 4.1*** |

exposure, severe, significant leaf abscission occurred in the two genotypes (Table 1). Leaf fall was located at the lower parts of the stems and went on toward the top. Leaf fall was more severe in *Robusta* than in *Carpaccio*, and its rate increased earlier (Table 1). At the end of the O₃ treatment, leaf abscission tended to stabilize for *Robusta* (36 to 37%), while it was still increasing for *Carpaccio* (27%). Overall, careful observation of leaf injuries and monitoring of leaf abscission strengthened our general visual conclusion of a higher O₃ sensitivity of the *Robusta* genotype.

Net CO₂ assimilation and total chlorophyll contents

The two genotypes displayed comparable rates of CO₂ assimilation in control conditions (Fig. 4A, B).

In response to O₃ treatment, CO₂ assimilation by the two genotypes gradually decreased (Fig. 4A, B). The decrease in CO₂ assimilation in response to ozone was significant ($P < 0.05$) for the two genotypes at the end of O₃ exposure (days 15 and 17). However, no significant difference was detected between the two genotypes (Table 2). In control conditions, the Chl content of ML increased during the experimental period, with higher values for *Robusta* compared to *Carpaccio* (Fig. 4C, D). Ozone treatment reduced the total Chl content of the two genotypes. The decrease became significant on day 11 of the treatment for *Robusta* (Fig. 4D) and on day 15 for *Carpaccio* (Fig. 4C). Genotype effect between the O₃-treated trees was only significant on day 11 (Table 2). At the end of the O₃ treatment, *Carpaccio* retained only 45% of its total Chl content and *Robusta* 50%.

Carboxylase activities

In response to O₃ fumigation, we measured a significant increase in PEPC activity in the leaves of the two poplar genotypes (Fig. 5A, B). However, the curves were slightly different for the two genotypes. The differences between control and O₃-treated leaves became highly significant from day 4 ($P < 0.01$) for *Robusta*, but only from day 11 for *Carpaccio* ($P < 0.001$; Fig. 5A, B). Maximum PEPC activity values were recorded on day 15 after the beginning of fumigation for the two genotypes. Moreover, on days 15 and 17, the activity levels in O₃-treated leaves were slightly higher and statistically significant for *Robusta* compared to *Carpaccio* (Table 2). Conversely to PEPC activity, Rubisco activity gradually decreased in ozone-treated leaves (Fig. 5C, D). That decrease was significant from day 11 of the O₃ treatment for the two genotypes (Fig. 5C, D). Rubisco activity inhibition reached a maximum on day 17 (30% and 37% for *Carpaccio* and *Robusta*, respectively). The differences between the two genotypes in O₃-treated leaves were not significant (Table 2).

NADP-dependent enzymatic activities: NADP-ME, NADP-ICDH, NADP-G6PDH and NADP-GAPDH

We hypothesized that the results presented in this section were predominantly related to the activity of cytosolic NADP-dehydrogenases. Such a hypothesis could be justified by several works on *Arabidopsis thaliana*, which show that cytosolic isoform mutants lose most of the total activity in crude leaf extracts (Wakao et al. 2008, Mhamdi et al. 2010, Voll et al. 2012). Concerning NADP-GAPDH, no significant change occurred in response to O₃ treatment in either genotype (Fig. 6A, B). In contrast, NADP-G6PDH activity clearly increased

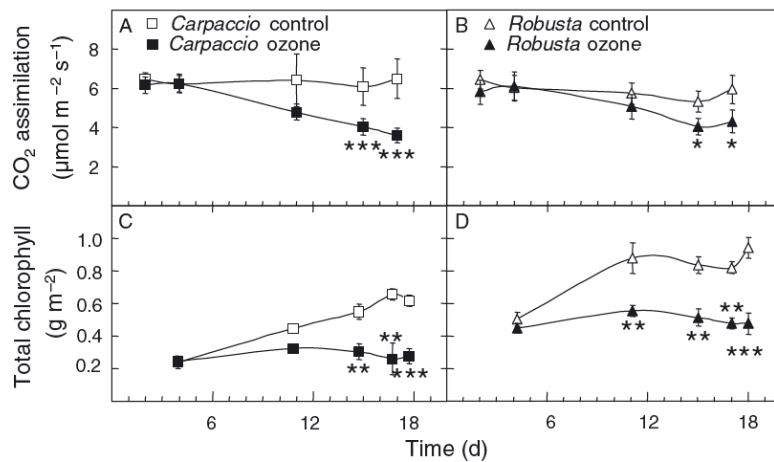


Fig. 4. Effect of O₃ treatment on CO₂ assimilation (A, B) (n = 6 ± se) and on total chlorophyll contents (C, D) (n = 20 ± se) respectively in O₃-treated and control ML leaves of *Carpaccio* (A, C) and *Robusta* (B, D) genotypes. Type III ANOVA tests performed with R stat 2011, considering O₃-treatment and genotypes as variability factors. Significant differences between O₃-treated and control leaves are indicated by * (P < 0.05), ** (P < 0.01) and *** (P < 0.001).

Table 2. Determination of genotype-dependent responses to O₃ using *t*-test. The test used the means of PEPC and Rubisco activity levels, net CO₂ assimilation rates (A), Chl contents, NADP-dependent dehydrogenase activity and pyridine nucleotide pools of control and O₃-treated *Carpaccio* (C-O₃) and *Robusta* (R-O₃). At all sampling dates for all the tested parameters (data not shown in the Table), *Carpaccio* and *Robusta* control means displayed no statistical difference at the 5% probability level. P values are given when *Carpaccio* (C-O₃) values were significantly higher (+) or lower (-) than *Robusta* (R-O₃) values at the 5% probability level. 'ne': no genotype effect.

| | Genotypes | Day 2 P value | Day 4 P value | Day 11 P value | Day 15 P value | Day 17 P value | Day 18 P value |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| A | C-O ₃ | ne | ne | ne | ne | ne | |
| | R-O ₃ | | | | | | |
| Chl | C-O ₃ | ne | ne | — | ne | ne | ne |
| | R-O ₃ | | | 0.023 | | | |
| PEPC | C-O ₃ | ne | ne | ne | — | — | |
| | R-O ₃ | | | | 0.005 | 0.002 | |
| Rubisco | C-O ₃ | ne | ne | ne | ne | ne | |
| | R-O ₃ | | | | | | |
| NADP-G6PDH | C-O ₃ | ne | ne | + | + | ne | |
| | R-O ₃ | | | <0.001 | 0.016 | | |
| NADP-ME | C-O ₃ | ne | ne | + | + | + | |
| | R-O ₃ | | | <0.001 | 0.05 | 0.006 | |
| NADP-ICDH | C-O ₃ | ne | ne | ne | — | ne | |
| | R-O ₃ | | | | 0.028 | | |
| NADPH | C-O ₃ | ne | ne | + | + | ne | |
| | R-O ₃ | | | 0.026 | 0.044 | | |
| NADH | C-O ₃ | ne | ne | ne | ne | ne | |
| | R-O ₃ | | | | | | |
| NADP ⁺ | C-O ₃ | ne | ne | ne | ne | ne | |
| | R-O ₃ | | | | | | |
| NAD ⁺ | C-O ₃ | ne | ne | ne | ne | ne | |
| | R-O ₃ | | | | | | |

in ozone-exposed leaves, but the sequence of events of the stimulation process slightly differed between the two genotypes (Fig. 6C, D). In *Robusta*, NADP-G6PDH activity constantly increased and reached a maximum at the end of the fumigation period (day 17, Fig. 6D). In

Carpaccio, the activity reached a maximum on day 11 of the treatment (Fig. 6C). On days 11 and 15, a significant genotype effect was detected for O₃-treated trees with higher activity values for *Carpaccio* (Table 2). NADP-ME activity increased under O₃ treatment and reached

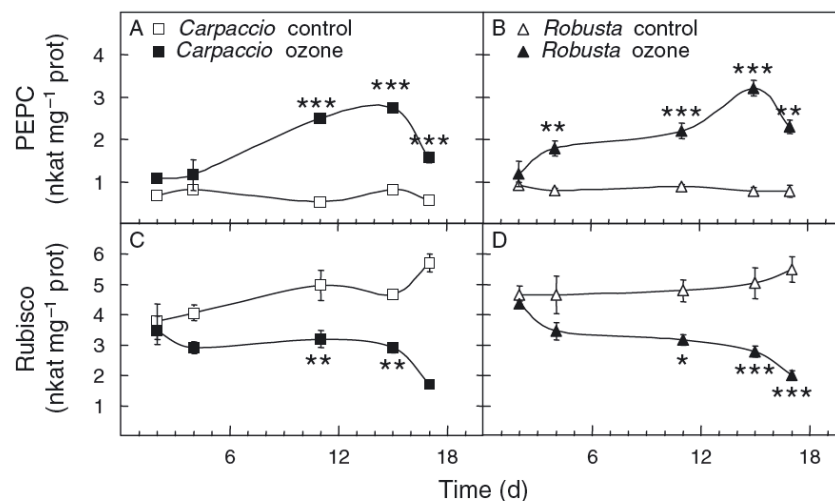


Fig. 5. Effect of O₃ treatment on PEPC activity (A, B) and on Rubisco (C, D) activity (nkat mg⁻¹ protein) in leaf protein extracts of *Carpaccio* (A, C) and *Robusta* (B, D) genotypes (n = 4 ± s.e.). Significant differences between the O₃-treated and control leaf extracts are indicated by * (P < 0.05), ** (P < 0.01) and *** (P < 0.001).

a maximum value on day 15 for the two genotypes (Fig. 6E, F). For this enzyme, a genotype effect was observed for O₃-treated trees on days 11, 15 and 17, with higher activity values for *Carpaccio* (Table 2). Similar to NADP-ME and NADP-G6PDH, NADP-ICDH activity was stimulated in O₃-treated leaves of the two genotypes (Fig. 6G, H). The activity reached a peak on day 15 for the two genotypes. However, at that sampling date, NADP-ICDH activity was lower in *Carpaccio* (Table 2).

Regarding the relationship between NADP-dependent enzyme activities versus PEPC activity, an approximate linear correlation prevailed, except for NADP-GAPDH (Fig. 7A–D). The correlation for NADP-ICDH versus PEPC was high ($r^2 \geq 0.9$), and no difference between the two genotypes was found (Fig. 7D). On the other hand, the genotype-dependent linear relation differed for NADP-ME and NADP-G6PDH versus PEPC (P values of 0.0003 and 0.0076, respectively). For those two NADP-dependent enzymes, the slopes of the linear regression were steeper for *Carpaccio* (Fig. 7A, C) than for *Robusta*. A linear relation was also found between NADP-ICDH versus NADP-ME activity in the two genotypes (Fig. 7E), with a higher slope for *Carpaccio*. However, the positive slope of this linear relation was below 1, showing a higher increase of NADP-ME activity in O₃-treated leaves of the two genotypes as compared to ICDH activity.

Leaf pyridine contents

In control conditions, the contents in oxidized or reduced pyridine nucleotide forms did not change in the leaves

of either poplar genotype (Fig. 8). However, changes were noticed in response to O₃ treatment. Concerning NADPH, its contents decreased in *Robusta* from the start of the O₃ treatment, with a significant difference on days 11 and 15 (Fig. 8B). The maximum decrease was reached on day 15 (60% of the control value). In contrast, no significant effect of O₃ treatment was noticed on NADPH contents for *Carpaccio* (Fig. 8A). Consequently, genotype effect in O₃-treated leaves (with higher values for *Carpaccio*) was significant on days 11 and 15 (Table 2). NADH contents (Fig. 8E, F) followed the same pattern as *Carpaccio* NADPH contents, without any difference between treatments (Fig. 8A, E). For *Robusta*, the lower NADH content in O₃-treated leaves was not significant (Fig. 8F). For NADH, no significant difference was found between the two genotypes all along the ozone treatment (Table 2). Concerning the oxidative forms of pyridine nucleotides, we observed a decrease in NADP⁺ contents for *Carpaccio* (Fig. 8C). This decrease was significant on day 15 (P < 0.05). For *Robusta*, few changes occurred in the NADP⁺ pool in response to O₃ fumigation. Moreover, NAD⁺ curves showed similar patterns in the O₃-treated leaves from the two genotypes: nearly twice as high levels as in the control were found after 15 and 17 days' exposure for the two genotypes. Considering the changes in NAD⁺ or NADP⁺ contents in the O₃-treated leaves, no genotype effect was noticed (Table 2). Taking these results into account, we can consider that in response to O₃ exposure, the main changes in the pyridine nucleotide forms occurred at the end of the fumigation period. On day 15, NADH/NAD⁺ ratios in O₃-treated leaves dropped by approximately

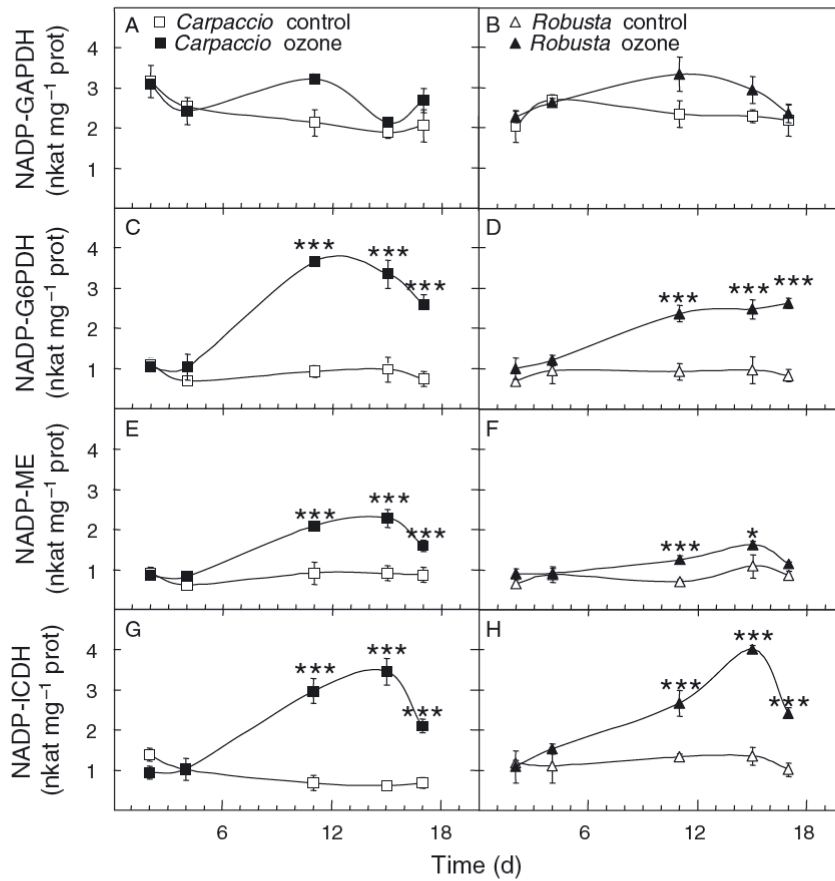


Fig. 6. Effect of O₃ treatment on NADP-GAPDH activity (A, B), on NADP-G6PDH activity (C, D), on NADP-ME activity (E, F) and on NADP-ICDH (G, H) activity (nkat mg⁻¹ protein) in leaf-protein extracts of *Carpaccio* (A, C, E, G) and *Robusta* (B, D, F, H) genotypes (n = 4 ± se). Significant differences between the O₃-treated and control leaf extracts are indicated by * (P < 0.05), ** (P < 0.01) and *** (P < 0.001).

50–60% for the two genotypes with a concomitant increase of the NAD(H) pool (Table 3). For *Carpaccio*, the NADPH/NADP⁺ ratio increased while it decreased by 50% for *Robusta*. On day 15, the NADP(H) pool tended to decrease for the two genotypes and the total amounts of all the pyridine nucleotide forms (reduced as well as oxidized) were fairly similar for either control or O₃ treatment for the two genotypes.

Discussion

In this study, high daily O₃ exposure (120 ppb) induced different responses on two poplar genotypes in terms of symptoms and acceleration of foliar senescence. We visualized different types of leaf injuries. They first appeared within a few days on *Robusta* and consisted in large mottle necrosis, first on ML and subsequently on younger leaves. For *Carpaccio*, O₃ necroses were mainly located on ML and consisted in brownish stippling. Acceleration of leaf abscission, another characteristic of O₃ sensitivity on aspen (Karnosky et al. 1996, Yun

and Laurence 1999, Ribas et al. 2005, Häikiö et al. 2009), was also more noticeable on *Robusta* and started a few days after the beginning of O₃ fumigation. We interpreted all these visual features as different levels of sensitivity to O₃ and concluded that *Robusta* was more sensitive to O₃ than *Carpaccio*.

All along the O₃ treatment, no major difference in POD₀ was observed between the two genotypes. Considering this fact, the differential O₃ sensitivity of the two genotypes could be attributed to biochemical responses rather than to differential stomatal O₃ uptake. As already shown on different poplar species, a decrease in CO₂ assimilation is one of the effects of O₃ exposure (Reich 1983, Yun and Laurence 1999, Bortier et al. 2000, Bagard et al. 2008). In this study, the decrease in CO₂ assimilation occurred to the same extent for the two genotypes. The evolution of chlorophyll contents and of rubisco activity could partly account for the decrease in CO₂ assimilation capacity. For these two parameters, O₃ exposure had the same effect or nearly the same effect on the two genotypes depending on sampling times.

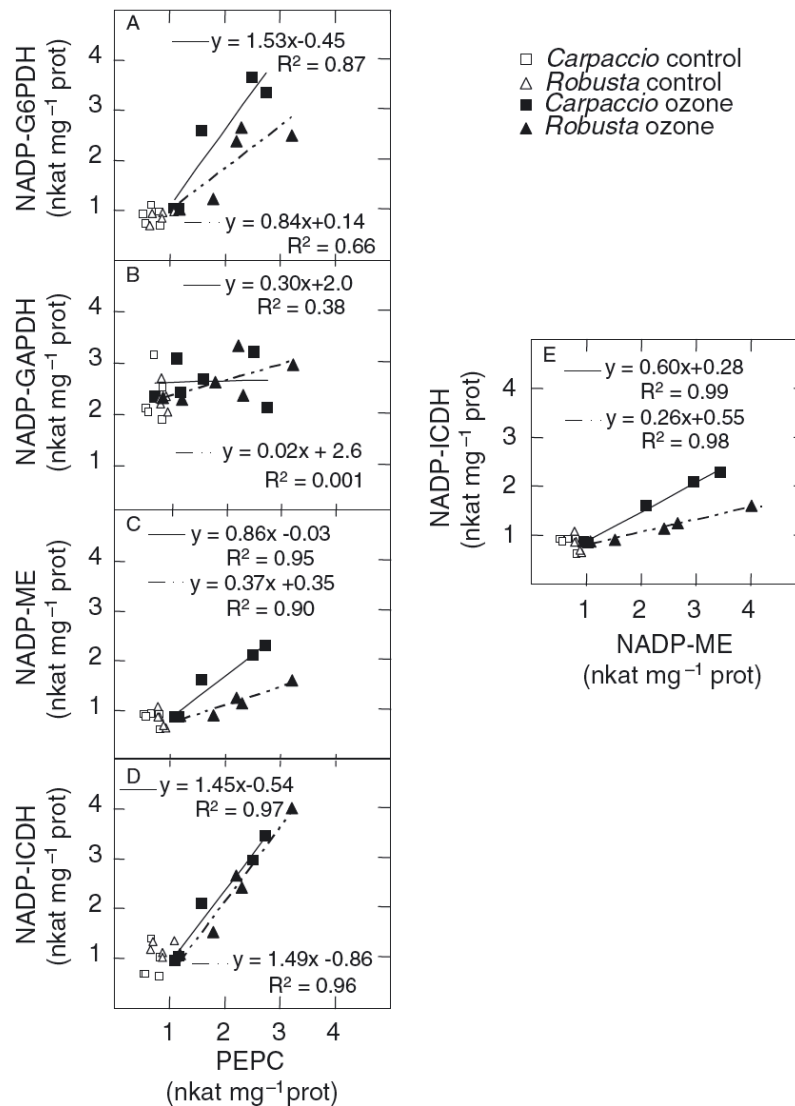


Fig. 7. Linear regression of NADP-G6PDH activity (A), NADP-GAPDH activity (B), NADP-ME activity (C) and NADP-ICDH (D) activity in relation to PEPC activity and NADP-ICDH activity versus NADP-ME activity (E) of *Carpaccio* and *Robusta* genotypes.

The reduction in Rubisco content and activity has been recorded in leaves of many species undergoing an oxidative stress and has been linked to several mechanisms such as (1) an increase in its proteolysis (Peñarrubia and Moreno 1990), (2) protein and/or mRNA synthesis inhibition (Brendley and Pell 1998, Pelloux et al. 2001, Bohler et al. 2007) and (3) protein fragmentation or structure modification due to ROS production (Ishida et al. 1997, Pell et al. 1999, Junqua et al. 2000, Abat et al. 2008). An increase in PEPC activity was distinctly observed for the two genotypes; that kind of O₃-induced effect has been previously mentioned for poplar trees (Landolt et al. 1997, Dizengremel 2001). PEPC

activation, among other carbon metabolism changes, is believed to provide carbon intermediates used for repair processes (Dizengremel 2001). The increase in PEPC activity is generally linked to an increase in both the amounts of PEPC protein and transcripts (Dizengremel 2001, Fontaine et al. 2003, Matyssek et al. 2006). In our work, we showed that for the two genotypes, the increase in PEPC activity was quite well correlated to the increase in NADP-ICDH activity. This relation supports the hypothesis of an anapleurotic function of PEPC to fuel the Krebs cycle by providing precursors for amino acid synthesis, and of its contribution to cell maintenance in case of severe oxidative stress (Hodges et al. 2003).

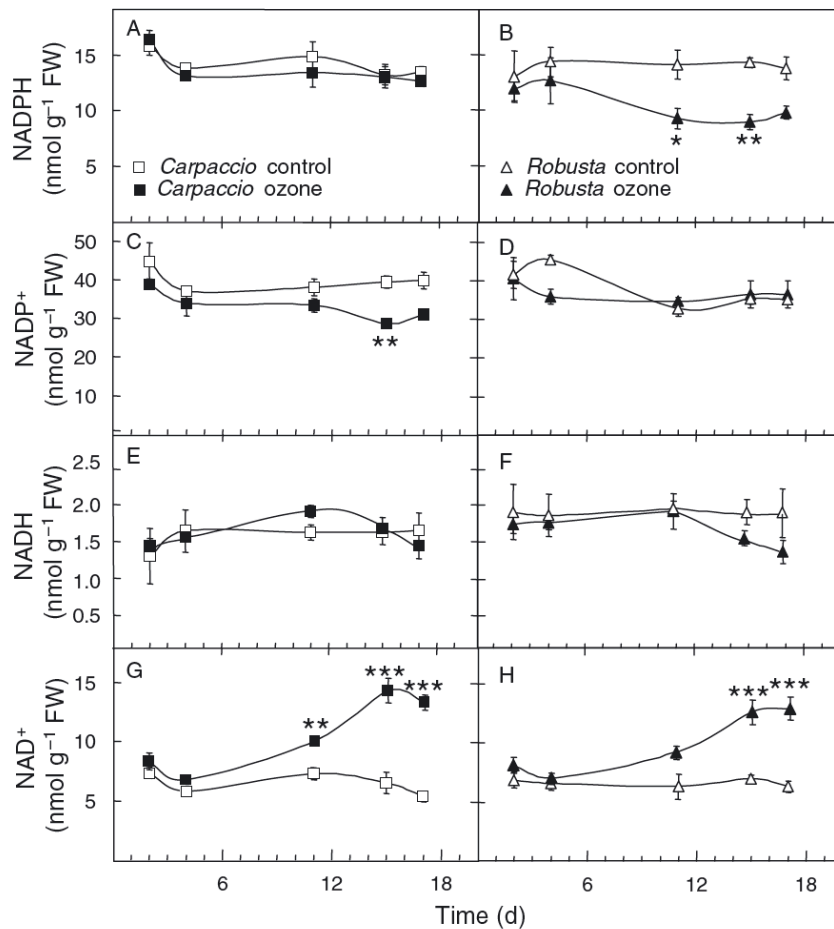


Fig. 8. Effect of O₃ treatment on NADPH (A, B), NADP⁺ (C, D), NADH (E, F) and NAD⁺ (G, H) contents (nmol g⁻¹ FW) in leaf-protein extracts of *Carpaccio* (A, C, E, G) and *Robusta* (B, D, F, H) genotypes (n = 4 ± se). Significant differences between the O₃-exposed and control extracts are indicated by * (P < 0.05), ** (P < 0.01) and *** (P < 0.001).

Table 3. NAD(P)H/NAD(P) ratios and total NAD(P)H (nmol g⁻¹ FW) pools in the leaves of control (C) and 15-day ozone-treated (O₃) *Carpaccio* and *Robusta* genotypes.

| | C-C | C-O ₃ | R-C | R-O ₃ |
|---|------|------------------|------|------------------|
| NADH/NAD ⁺ | 0.22 | 0.11 | 0.26 | 0.11 |
| NADPH/NADP ⁺ | 0.33 | 0.49 | 0.36 | 0.26 |
| ∑ NAD(H)(nmol g ⁻¹ FW) | 8.0 | 15.8 | 8.8 | 13.8 |
| ∑ NADP(H) (nmol g ⁻¹ FW) | 52.7 | 41.6 | 46.2 | 41.7 |
| ∑ Total pyridine pool (nmol g ⁻¹ FW) | 60.7 | 57.4 | 55.0 | 55.5 |

Processed by cytosolic NADP-ICDH, this reaction also yields NADPH. The higher stimulation of NADP-ICDH activity in *Carpaccio* may contribute to maintain higher levels of NADPH in the cytosol of the tolerant genotype. Starting from malate, the anapleurotic pathway of the Krebs cycle can also use NADP-ME, which is also likely to increase the pool of cytosolic NADPH. NADP-ME

activation has been shown in several C₃ and C₄ plants in response to several abiotic stresses known to modify cell redox homeostasis (Valderrama et al. 2006, Maier et al. 2011), especially in response to O₃ (Dizengremel et al. 2009, Guidi et al. 2009). In addition, by supplying NADPH and pyruvate, NADP-ME participates in fatty acid biosynthesis (Edwards and Andreo 1992) and also in defense-related lignin and flavonoid formation in stress conditions (Casati et al. 1999). In our work, the stimulation of NADP-ME activity occurred in the two poplar genotypes, but the effect was more important in *Carpaccio*, the tolerant genotype. Furthermore, in that genotype, the correlation between PEPC activity and NADP-ME activity appeared stronger. These results argue in favor of an important role for NADP-ME in providing cytosolic NADPH in response to ozone treatment, and perhaps in conferring *Carpaccio* higher tolerance to ozone. Considering that the same relation

was not found in other species (Guidi et al. 2009), that last conclusion will have to be supported by other results.

In case of a stress, the stimulation of NADP-G6PDH activity is supposed to supply the cytosol with NADPH. However, its involvement in the pentose-phosphate pathway also implies providing higher amounts of sugar-intermediates for lignin biosynthesis, which is believed to play a defensive role in case of O₃ exposure (Cabané et al. 2004). Our work showed that its activity was also stimulated in the two genotypes in response to O₃ fumigation, but with higher values in *Carpaccio*. The high correlation between the increase in NADP-G6PDH and PEPC activity levels supports the hypothesis that in case of O₃-induced oxidative stress, several pathways, all likely to provide the cytosol with NADPH, were activated simultaneously. Conversely, NADP-GAPDH, also known to provide cytosolic NADPH, displayed much lower changes in their activity levels in response to O₃ treatment.

NADPH is considered as one of the most vital factors in cell growth, maintenance and detoxification. The large necroses and the early abscissions observed on *Robusta* leaves could result from lower NADPH availability. In *Robusta*, a drop in NADPH content was evidenced, especially at the end of O₃ exposure, while *Carpaccio* was able to maintain the same pool of reduced pyridine nucleotides as the controls all along the treatment. These results are in agreement with the fact that *Carpaccio* is more able to regenerate NADPH by increasing certain cytosolic NADP-dependent dehydrogenase activities in case of O₃ stress. In good accordance with what is commonly observed at the cell level, the NADPH/NADP ratio remained higher than the NADH/NAD ratio for which the reduced form (NADH) can reach 5–20% (Noctor et al. 2011). Moreover, the NADH/NAD ratio undergoes important variations that depend on leaf cellular compartments and light/dark conditions (Heineke et al. 1991, Igamberdiev and Gardeström 2003, Szal et al. 2008). In the cell, NADP is produced from NAD by NAD(H) kinases (Turner et al. 2004, Noctor et al. 2006), which are suggested to play an important role in providing cellular NADPH in response to a wide range of oxidative-related stresses (Hayashi et al. 2005, Chai et al. 2006, Noctor 2006). In our experimental conditions, the total amounts of phosphorylated pyridine nucleotides (NADP(H)) decreased in the two genotypes, probably in favor of the non-phosphorylated pool. Therefore the NAD(H) phosphorylation process did not seem to be involved in response to ozone treatment.

To conclude, our work showed that O₃ treatment caused a significant increase in the activity of all key cytosolic NADP-dependent enzymes we assayed, except

NADP-GAPDH. That increase may be justified by an increased NADPH demand for detoxification and repair processes. In fact, we determined that only *Carpaccio*, qualified in our work as the more tolerant genotype, was able to maintain its NADPH pool during O₃ treatment, while *Robusta* was not. Differential responses could be associated to a higher stimulation of both NADP-ME and NADP-G6PDH in the more tolerant genotype. Using mutants with a low activity level for these enzymes would make it possible to assess their role in ozone-tolerance mechanisms.

Acknowledgements—This work is part of the Vulnoz project funded by the following French institutions: Agence Nationale de la Recherche, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors thank Stéphane Martin, Fabien Spicher and Jacques Banvoy for technical support, Pierre Montpied for advice about statistical analyses and Annie Buchwalter for English proof-reading.

References

- Abat JK, Saigal PT, Deswal R (2008) S-nitrosylation another biological switch like phosphorylation? *Physiol Mol Biol Plants* 14: 119–130
- Ashmore MR (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant Cell Environ* 28: 949–964
- Bagard M, Le Thiec D, Delacôte E, Hasenfratz-Sauder MP, Banvoy J, Gérard J, Dizengremel P, Jolivet Y (2008) Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiol Plant* 134: 559–574
- Batz O, Logemann E, Reinold S, Hahlbrock K (1998) Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Chem Biol* 379: 1127–1135
- Baumgarten M, Huber C, Bükér P, Emberson L, Dietrich HP, Nunn AJ, Heerdt C, Beudert B, Matyssek R (2009) Are Bavarian Forests (southern Germany) at risk from ground-level ozone? Assessment using exposure and flux based ozone indices. *Environ Pollut* 157: 2091–2107
- Bohler S, Bagard M, Oufir M, Planchon S, Hoffmann L, Jolivet Y, Hausman JF, Dizengremel P, Renaut J (2007) A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics* 7: 1584–1599
- Bortier K, Ceulemans R, de Temmerman L (2000) Effects of tropospheric ozone on woody plants. In: Agrawal M (ed) *Environmental Pollution and Plant Responses*. Lewis Publishers, Boca Raton FL, pp 153–182
- Brendley BW, Pell EJ (1998) Ozone-induced changes in biosynthesis of Rubisco and associated compensation to stress in foliage of hybrid poplar. *Tree Physiol* 18: 81–90

- Bustos DM, Iglesias AA (2003) Phosphorylated non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from heterotrophic cells of wheat interacts with 14-3-3 proteins. *Plant Physiol* 133: 2081–2088
- Bustos DM, Bustamante CA, Iglesias AA (2008) Involvement of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in response to oxidative stress. *J Plant Physiol* 165: 456–461
- Cabané M, Pireaux JC, Leger E, Weber E, Dizengremel P, Pollet B, Lapiere C (2004) Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. *Plant Physiol* 134: 586–594
- Casati P, Spampinato CP, Andreo CS (1997) Characteristics and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat. *Plant Cell Physiol* 38: 928–934
- Casati P, Drincovich MF, Edwards GE, Andreo CS (1999) Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynth Res* 61: 99–105
- Castagna A, Ranieri A (2009) Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environ Pollut* 157: 1461–1469
- Chai MF, Wei PC, Chen QJ, An R, Chen J, Yang S, Wang XC (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: 665–674
- Di Baccio D, Castagna A, Paoletti E, Sebastiani L, Ranieri A (2008) Could the differences in O₃ sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O₃ influx? *Tree Physiol* 28: 1761–1772
- Dizengremel P (2001) Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiol Biochem* 39: 729–742
- Dizengremel P, Le Thiec D, Bagard M, Jolivet Y (2008) Ozone risk assessment for plants: central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environ Pollut* 156: 11–15
- Dizengremel P, Le Thiec D, Hasenfratz-Sauder MP, Vaultier MN, Bagard M, Jolivet Y (2009) Metabolic-dependent changes in plant cell redox power after ozone exposure. *Plant Biol* 11: 35–42
- Doubnerová V, Ryslava H (2011) What can enzymes of C₄ photosynthesis do for C₃ plants under stress? *Plant Sci* 180: 575–583
- Edwards GE, Andreo CS (1992) NADP-malic enzyme from plants. *Phytochem* 31: 1845–1857
- Emes MJ, Neuhaus HE (1997) Metabolism and transport in nonphotosynthetic plastids. *J Exp Bot* 48: 1995–2005
- Fares S, Loreto F, Kleist E, Wildt J (2008) Stomatal uptake and stomatal deposition of ozone in isoprene and monoterpene emitting plants. *Plant Biol* 10: 44–54
- Fontaine V, Pelloux J, Podor M, Afif D, Gérant D, Grieu P, Dizengremel P (1999) Carbon fixation in *Pinus halepensis* submitted to ozone. Opposite response of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase. *Physiol Plant* 105: 187–192
- Fontaine V, Cabané M, Dizengremel P (2003) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Pinus halepensis* needles submitted to ozone and water stress. *Physiol Plant* 117: 445–452
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiol* 155: 2–18
- Fuhrer J, Skarby L, Ashmore MR (1997) Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environ Pollut* 97: 91–106
- Fukayama H, Hatch MD, Tamai T, Tsuchida H, Sudoh S, Furbank RT, Miyao M (2003) Activity regulation and physiological impacts of maize C₄-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants. *Photosynth Res* 77: 227–239
- Gaucher C, Costanzo N, Afif D, Mauffette Y, Chevrier N, Dizengremel P (2003) The impact of elevated ozone and carbon dioxide on young *Acer saccharum* seedlings. *Physiol Plant* 117: 392–402
- Gerosa G, Finco A, Mereu S, Marzuoli R, Ballarin-Denti A (2009) Interactions among vegetation and ozone, water and nitrogen fluxes in a coastal Mediterranean maquis ecosystem. *Biogeosciences* 6: 1783–1798
- Guidi L, Degl'Innocenti E, Martinelli F, Piras M (2009) Ozone effects on carbon metabolism in sensitive and insensitive *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Environ Exp Bot* 66: 117–125
- Gupta VK, Singh R (1988) Partial purification and characterization of NADPC-isocitrate dehydrogenase from immature pod walls of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Physiol* 87: 741–744
- Häikiö E, Freiwald V, Julkunen-Tiitto R, Beuker E, Holopainen T, Oksanen E (2009) Differences in leaf characteristics between ozone sensitive and tolerant hybrid aspen (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) clones. *Tree Physiol* 29: 53–66
- Hayashi M, Takahashi H, Tamura K, Huang J, Yu LH, 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 USA* 102: 7020–7025
- Heineke D, Riens B, Grosse H, Hoferichter P, Peter U, Flügge U-I, Heldt HW (1991) Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiol* 95: 1131–1137
- Hodges M, Flesch V, Galvez S, Bismuth E (2003) Higher plant NADP-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. *Plant Physiol Biochem* 41: 577–585
- 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: 117–125
- Ishida H, Nishimori Y, Sugisawa M, Makino A, Mae T (1997) The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol* 38: 471–479
- Junqua M, Biolley JP, Pie S, Kanoun M, Durand R, Goulas P (2000) In vivo occurrence of carbonyl residues in *Phaseolus vulgaris* proteins as a direct consequence of a chronic ozone stress. *Plant Physiol Biochem* 38: 853–861
- Karnosky DF, Gagnon ZE, Dickson RE, Coleman MD, Lee EH, Isebrands JG (1996) Changes in growth, leaf abscission, and biomass associated with seasonal tropospheric ozone exposures of *Populus tremuloides* clones and seedlings. *Can J Forest Res* 26: 23–37
- Karnosky DF, Pregitzer KS, Zak DR, Kubisce ME, Hendrey GR, Weinstein D, Nosal M, Percy KE (2005) Scaling ozone responses of forest trees to the ecosystem level in a changing climate. *Plant Cell Environ* 28: 965–981
- Karnosky D, Skelly J, Percy K, Chappelka A (2007) Perspectives regarding 50 years of research on effects of tropospheric ozone air pollution on US forests. *Environ Pollut* 147: 489–506
- Landolt W, Gunthardt-Goerg MS, Pfenninger I, Einig W, Hampp R, Maurer S, Matyssek R (1997) Effect of fertilization on ozone-induced changes in the metabolism of birch (*Betula pendula*) leaves. *New Phytol* 137: 389–397
- Maier A, Zell MB, Maurino VG (2011) Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C₄ and C₃ photosynthesis. *J Exp Bot* 62: 3061–3069
- Matyssek R, Innes JL (1999) Ozone – a risk factor for trees and forests in Europe? *Water Air Soil Poll* 116: 199–226
- Matyssek R, Wieser G, Nunn AJ, Kozovits AR, Reiter IM, Heerdt C, Winkler JB, Baumgarten M, Haberle K-H, Grams TEE, Werner H, Fabian P, Havranek WM (2004) Comparison between AOT40 and ozone uptake in forest trees of different species, age and site conditions. *Atmos Environ* 38: 2271–2281
- Matyssek R, Le Thiec D, Löw M, Dizengremel P, Nunn AJ, Häberle KH (2006) Interaction between drought stress and O₃ stress in forest trees. *Plant Biol* 8: 11–17
- McLaughlin SB, Nosal M, Wullschlegel SD, Sun G (2007) Interactive effects of ozone and climate on tree growth and water use in a southern Appalachian forest in the USA. *New Phytol* 174: 109–124
- Mhamdi A, Mauve C, Houda G, Saindrenan P, Hodges M, Noctor G (2010) Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in Arabidopsis leaves. *Plant Cell Environ* 33: 1112–1123
- Møller IM, Rasmusson AG (1998) The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends Plant Sci* 3: 21–27
- Nemoto Y, Sasakuma T (2000) Specific expression of *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci* 158: 53–60
- Noctor G (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ* 29: 409–425
- Noctor G, Queval G, Gaklere B (2006) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J Exp Bot* 57: 1603–1620
- Noctor G, Hager J, Shengchun L (2011) Biosynthesis of NAD and its manipulation in plants. *Adv Bot Res* 58: 153–201
- Pell EJ, Eckardt N, Enyedi AJ (1992) Timing of ozone stress and resulting status of Ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytol* 120: 397–405
- Pell EJ, Sinn JP, Brendley BW, Samuelson L, Vinten-Johansen C, Tien M, Skillman J (1999) Differential response of four tree species to ozone-induced acceleration of foliar senescence. *Plant Cell Environ* 22: 779–790
- Pelloux J, Jolivet Y, Fontaine V, Banvoy J, Dizengremel P (2001) Changes in Rubisco and Rubisco activase gene expression and polypeptide content in *Pinus halepensis* M. subjected to ozone and drought. *Plant Cell Environ* 24: 123–131
- Peñarrubia L, Moreno J (1990) Increased susceptibility of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase to proteolytic degradation caused by oxidative treatments. *Arch Biochem Biophys* 281: 319–323
- Pitel JA, Cheliak WM (1986) Effectiveness of protective agents for increasing activity of five enzymes from vegetative tissues of white spruce. *Can J Bot* 64: 39–44
- Plöchl M, Lyons T, Ollerenshaw J, Barnes JD (2000) Simulating ozone detoxification in the leaf apoplast through the direct reaction with ascorbate. *Planta* 210: 454–467
- 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
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Reich PB (1983) Effects of low concentration of O₃ on net photosynthesis, dark respiration, and chlorophyll

- contents in aging hybrid poplar leaves. *Plant Physiol* 73: 291–296
- Renaut J, Bohler S, Hausman JF, Hoffmann L, Sergeant K, Ashan N, Jolivet Y, Dizengremel P (2009) The impact of atmospheric composition on plants: a case study of ozone and poplar. *Mass Spectrom Rev* 28: 495–516
- Ribas A, Peñuelas J, Elvira S, Gimeno BS (2005) Contrasting effects of ozone under different water supplies in two Mediterranean tree species. *Atmos Environ* 39: 685–693
- Smeets K, Cuyppers A, Lambrechts A, Semane B, Hoet P, Van Laere A, Vangronsveld J (2005) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol Biochem* 43: 437–444
- Smirnoff N (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann Bot* 78: 661–669
- Street NR, Tallis MJ, Tucker J, Brosché M, Kangasjärvi J, Broadmeadow M, Taylor G (2011) The physiological, transcriptional and genetic responses of an ozone-sensitive and an ozone tolerant poplar and selected extremes of their F2 progeny. *Environ Pollut* 159: 45–54
- Szal B, Dabrowska Z, Malmberg G, Gardeström P, Rychter A (2008) Changes in energy status of leaf cells as a consequence of mitochondrial genome arrangement. *Planta* 227: 697–706
- 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: 1243–1255
- UNECE (2004) Mapping Manual, UNECE Convention for Long-Range Transboundary Air Pollution, Manual on methodologies and criteria for modelling and mapping critical loads and levels and air pollution effects, risks and trends http://www.oekodata.com/icpmapping/pub/manual_2004/mapman_2004.pdf
- UNECE (2005) Forest Trees Working Group Report. Critical Level of Ozone: Further applying and developing the fluxed-based concept, Obergurgl, Tyrol, Austria, pp 15–19
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gomez-Rodriguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernandez-Ocana A, Del rio LA, Barroso JB (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell Environ* 29: 1449–1459
- Voll LM, Zell MB, Engelsdorf T, Saur A, Wheeler MG, Drincovich MF, Weber APM, Maurino VG (2012) Loss of cytosolic NADP-malic enzyme 2 in *Arabidopsis thaliana* is associated with enhanced susceptibility to *Colletotrichum higginsianum*. *New Phytol* 195: 189–202
- Vollenweider P, Woodcock H, Kelty MJ, Hofer RM (2003) Reduction of stem growth and site dependency of leaf injury in Massachusetts black cherries exhibiting ozone symptoms. *Environ Pollut* 125: 467–480
- Wakao S, Andre C, Benning C (2008) Functional analyses of cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenases and their contribution to seed oil accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146: 277–288
- Wildhagen H, Dürr J, Ehling B, Rennenberg H (2010) Seasonal nitrogen cycling in the bark of field-grown Grey poplar is correlated with meteorological factors and gene expression of bark storage proteins. *Tree Physiol* 30: 1096–1110
- Wittig VE, Ainsworth EA, Naidu SL, Karnoski DF, Long SP (2009) Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. *Glob Change Biol* 15: 396–424
- Yun S-C, Laurence J (1999) The response of clones of *Populus tremuloides* differing in sensitivity to ozone in the fields. *New Phytol* 141: 411–421

Edited by P. Gardeström

5. CHAPITRE N° 2 : Importance de l'isocitrate déshydrogénase cytosolique et de la glutathion réductase 1 dans la réponse lumière-dépendante à l'ozone chez *Arabidopsis*.

5.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous développons des travaux afin d'évaluer l'importance de l'une des déshydrogénases NADP-dépendante, la cICDH, en réponse à l'ozone. Pour parvenir à moduler l'activité de cette déshydrogénase nous avons utilisé un mutant déficient d'*Arabidopsis thaliana* pour l'unique isoforme cytosolique de la cICDH, *icdh* et nous avons étudié la perte de cette fonction sur l'apparition de lésions, l'équilibre redox cellulaire, et certains marqueurs de stress / de mort cellulaire. Par ailleurs en considérant l'importance de la glutathion réductase (GR) dans la régénération de l'ascorbate, nous avons également étudié la réponse d'un mutant déficient en activité GR cytosolique (*gr1*). Les conditions expérimentales de cette étude correspondent à l'exposition de ces mutants à des doses aiguës (350 ppb) pendant 7h. L'un des aspects originaux de cette étude consiste également dans la modulation de la photopériode. De nombreux facteurs externes régulent les processus de développement et d'adaptation des plantes. Parmi tous ces facteurs environnementaux, la durée du jour est un indicateur important. Elle contrôle différentes phases de transition entre le stade juvénile, le stade végétatif et le stade reproducteur. En règle générale, les plantes dont le développement est lié au photopériodisme sont classées en trois grandes catégories. Les plantes sensibles au photopériodisme, dont le rythme biologique est régi par une photopériode plus courte ou plus longue que la photopériode critique, sont dites respectivement de jour court (SD, *short-day*) et de jour long (LD, *long-day*). Les plantes indifférentes au photopériodisme sont appelées neutres (DN, Day-neutral). *A. thaliana*, Col-0, est une plante LD facultative, dont la croissance sous une photopériode supérieure à 12h induit une accélération de la floraison de plusieurs semaines. La longueur de la photopériode exerce une influence significative sur la biomasse, la forme des feuilles, la morphologie cellulaire et sur l'ultrastructure des chloroplastes de cette plante. En général, les plantes d'*Arabidopsis* cultivées sous photopériode SD ou LD de même intensité lumineuse montrent respectivement des caractéristiques photosynthétiques et morphologiques typiques des plantes cultivées à l'ombre ou en plein soleil (Lepistö *et al.*, 2009). Comparées aux plantes d'*Arabidopsis* cultivées en SD, les plantes de LD possèdent des feuilles plus épaisses, des cellules du parenchyme palissadique plus allongées, une densité stomatique (le rapport entre le nombre de stomates au total et nombre de cellules de l'épiderme) plus élevée (40%) et des grana plus petits (Lepistö *et al.*, 2009).

Les stomates sont le principal site d'absorption et de régulation de flux d'O₃ au niveau des espaces intercellulaires foliaires (Emberson *et al.*, 2000). Même si les concentrations estivales d'O₃ sont beaucoup moins élevées dans le Nord de l'Europe comparé aux pays du Sud, les effets négatifs de ce gaz phototoxique sur la végétation naturelle ou semi-naturelle sont plus élevés (Pleijel *et al.*, 2000; De Temmerman *et al.*, 2002; Timonen *et al.*, 2004). Pour expliquer ce surprenant résultat, deux hypothèses en relation avec les conditions climatiques ont été avancées.

La première, met l'accent sur l'état d'ouverture des stomates, qui serait favorisée par les conditions climatiques favorables des régions du Nord de l'Europe (durée d'ensoleillement plus longue, des températures moyennes plus basses et un climat humide (Pleijel *et al.*, 2000). La deuxième hypothèse, qui n'exclut pas la première, suggère que les nuits courtes des régions du nord de l'Europe ne permettent pas l'accomplissement des processus de réparation et détoxification des dommages oxydatifs engendrés par l'O₃ durant la journée (De Temmerman *et al.*, 2002).

5.2. Publication

1 **Analysis of cytosolic isocitrate dehydrogenase and glutathione reductase 1 in photoperiod-**
2 **influenced responses to ozone using *Arabidopsis* knockout mutants**

3
4 Ata Allah Dghim^{1,2,3#}, Amna Mhamdi^{4#}, Marie Noelle Vaultier^{1,2,3}, Marie Paule Hasenfratz-
5 Sauder^{1,2,3}, Didier Le Thiec^{2,3}, Pierre Dizengremel^{1,2,3}, Graham Noctor⁴, Yves Jolivet^{1,2,3}

6

7

8 ¹Université de Lorraine, UMR1137 EEF, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France

9 ²INRA, UMR1137 EEF, F-54280 Champenoux, France

10 ³IFR110 EFABA, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France

11 ⁴Institut de Biologie des Plantes, UMR CNRS 8618, Université de Paris sud 11, 91405 Orsay
12 cedex, France

13

14 #These authors made an equal contribution to this work

15

16

17

18 Corresponding author: Yves Jolivet

19

20

21 Running title: ICDH and GR1 in ozone responses

22

23

24

25

26

27 **Key words:** Oxidative stress, ozone, glutathione, NADP-dehydrogenases, salicylic acid, icdh, gr1

28 **SUMMARY**

29
30 Oxidative stress caused by tropospheric ozone (O₃) significantly affects plant development.
31 Because of the complexity of the antioxidative system, the roles of specific redox-homeostatic
32 enzymes in O₃ responses are still unclear. Here, we used a reverse genetics approach to investigate
33 the importance of cytosolic enzymes involved in NADP and glutathione reduction. Analysis of
34 *Arabidopsis* Col-0 revealed that growth day length significantly affects the phenotypic outcome of
35 O₃ exposure. In short-day conditions (SD), few or no lesions were elicited by treatments that caused
36 extensive lesions in long days (LD). Analysis of major leaf redox pools revealed that lesion
37 formation was not associated with significant perturbation of glutathione, ascorbate, NADP(H), or
38 NAD(H). To investigate the roles of two candidate genes potentially underpinning this stability, O₃
39 responses of T-DNA mutants for the major leaf isocitrate dehydrogenase (*icdh*) and glutathione
40 reductase 1 (*gr1*) were analysed. Loss of cytosolic ICDH function did not affect lesion formation in
41 LD but glutathione was significantly more oxidized than in wild-type. This effect was accompanied
42 by enhanced O₃ induction of other cytosolic NADPH-producing enzyme activities and of
43 pathogenesis-related gene 1 (*PR1*). In the *gr1* mutant, O₃-triggered lesion formation, accumulation
44 of salicylic acid, and induction of *PR1* were all decreased relative to Col-0 despite enhanced
45 accumulation of glutathione. Our study therefore reveals an important role for day length conditions
46 in influencing O₃ responses, points to overlapping functions of NADP-dependent dehydrogenases,
47 and highlights novel roles for the glutathione system in controlling the interactions between
48 antioxidative and oxidative signalling functions.

49 **INTRODUCTION**

50

51 As a major air pollutant, tropospheric ozone (O₃) is a rising threat to crop yield and to the diversity
52 of worldwide natural vegetation (Ashmore 2005). It is well established that global background O₃
53 concentrations are continuously increasing at an annual rate of 0.5–2% in the mid-latitude northern
54 hemisphere (Vingarzan 2004). Current tropospheric O₃ concentrations range between 25 and 50 nL
55 L⁻¹ and can lead to harmful effects on vegetation that include visible injury, growth decline, early
56 leaf senescence/drop and ultimately to premature death (Booker *et al.* 2009; Mills *et al.* 2011).
57 These effects are mainly caused by O₃ entry into the leaf through stomata and the subsequent
58 generation of various reactive oxygen species (ROS; Laisk *et al.* 1989). ROS accumulation may
59 have a direct harmful effect on the cell, resulting in necrosis and/or chlorosis, or act as signalling
60 molecules that can induce programmed cell death (PCD) (Mittler *et al.* 2004; Overmyer *et al.*
61 2005). In O₃-treated plants, as in response to certain plant pathogens, PCD is linked to accumulation
62 of salicylic acid (SA; Ernst *et al.* 1992; Sharma *et al.* 1996). Work using *Arabidopsis* mutants in the
63 SA synthesis or signalling pathway such as *sid2* or *npr1* points to a double role played by SA in O₃
64 response, with high SA in treated plants inducing defence responses and promoting cell death (Rao
65 & Davis 1999; Rao *et al.* 2000; Overmyer *et al.* 2005; Yoshida *et al.* 2009).

66

67 The impact of O₃ is limited by the antioxidative system, a complex network of enzymes encoded by
68 multiple genes (Mittler *et al.* 2004). Given the stomatal entry of O₃, apoplastic ascorbate is often
69 considered to be the first line of defence (Smirnoff 1996, Plöchl *et al.* 2000; Matyssek *et al.* 2012),
70 but intracellular redox buffering systems may also influence O₃ sensitivity. In addition to ascorbate,
71 these systems include glutathione, flavonoids, α -tocopherol and a battery of ROS-scavenging
72 enzymes such as catalase (CAT), glutathione *S*-transferases, glutathione reductase (GR), and
73 peroxidases (Mittler *et al.* 2004; Castagna and Ranieri 2009). Ascorbate and glutathione are known
74 to play a central role in biotic stress, senescence, and cell cycle regulation (Barth *et al.* 2006; Foyer
75 & Noctor 2011). Regeneration of ascorbate and glutathione involves enzymes such as GR and
76 NADP-linked dehydrogenases that ultimately provide the reducing power to these major
77 antioxidant pools (Foyer & Noctor 2009).

78

79 The production of NADPH in the cytosol could be a key factor in O₃ tolerance, and is dependent on
80 enzymatic reactions linked to carbon metabolism (Dizengremel *et al.* 1994; Noctor 2006;
81 Dizengremel *et al.* 2009; Dghim *et al.* 2012). In fact, O₃ induces a decrease in Calvin cycle activity
82 that is accompanied by decreased Rubisco activity and induction of PEPC activity (Pell *et al.* 1992;

83 Dizengremel *et al.* 2001; Bagard *et al.* 2008; Ahsan *et al.* 2010). The stimulation of PEPC activity
84 is believed to contribute to activation of the anapleurotic pathway, allowing oxaloacetate or malate
85 to be supplied to the Krebs cycle (Dizengremel *et al.* 2009; Dizengremel *et al.*, 2012). Additionally,
86 increased PEPC activity can be accompanied by higher activity of both cytosolic NADP-ME and
87 NADP-ICDH (cICDH) which could contribute to the increased demand for NADPH. In the cytosol,
88 two other NADP-dehydrogenases (NADP-GAPDH and G6PDH) may also be involved in NADPH
89 biosynthesis.

90
91 While these responses point to potentially important functions of NADP-linked dehydrogenases in
92 O₃ responses, there have been very few studies in which their biological importance has been tested
93 by loss of specific gene functions. *Arabidopsis* T-DNA knockout lines provide excellent systems to
94 analyse such questions. One such available mutant is *icdh*, which lacks the cytosolic (major) form
95 of ICDH. This line has only about 10% extractable ICDH activity of the wild-type (Mhamdi,
96 Mauve, Gouia, Saindrenan, Hodges & Noctor 2010b). Analysis of this mutant revealed that cICDH
97 is largely dispensable for growth in optimum conditions but that it may play roles in redox
98 homeostasis and the response to pathogens (Mhamdi *et al.* 2010b). Two genes encode GR in
99 *Arabidopsis*, with GR1 encoding a dual-addressed cytosolic and peroxisomal enzyme (Kataya &
100 Reumann 2010). T-DNA mutants for GR1 have about 40-60% of total wild-type leaf activity and
101 show no phenotype in optimal growth conditions (Marty *et al.* 2009; Mhamdi, Hager, Chaouch,
102 Queval, Han, Tacconnat, Saindrenan, Gouia, Issakidis-Bourguet, Renou & Noctor 2010a). When this
103 mutation is introduced into a catalase-deficient oxidative stress background, however, it greatly
104 exacerbates oxidative stress (Mhamdi *et al.* 2010b, 2010a). The *gr1* mutation also compromises
105 resistance to pathogenic bacteria (Mhamdi *et al.* 2010a).

106
107 Given our previous observations using these mutants, and the potential importance of the cytosol in
108 the regulation of O₃ responses, we have used *icdh* and *gr1* to examine the specific importance of
109 GR and ICDH during exposure to acute doses of ozone. Because some previous studies indicate
110 that day length may influence oxidative stress responses, including responses to O₃ (Vollsnes *et al.*
111 2009), we performed experiments in both short and long day growth conditions. The results reveal
112 that growth day length exerts a significant influence over the phenotypic outcome of O₃ exposure
113 and point to novel roles for glutathione-dependent processes in regulating the extent of leaf damage
114 triggered by this oxidizing pollutant.

115 METHODS

116

117 Plant material, growth and sampling

118

119 The homozygous mutants used in this study were *icdh* (Mhamdi *et al.* 2010b) and *gr1* (Mhamdi *et*
120 *al.* 2010a) in the Columbia background. Seeds were incubated for 4 d at 4°C and then sown in 7-cm
121 pots containing a support medium of equal parts of perlite and vermiculite. Plants were placed in a
122 controlled-environment growth chamber at the specified photoperiod (as explained below) and
123 under an irradiance of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at leaf level, 20°C/18°C, 65% humidity. Plants were
124 transplanted individually into 3 cm pots containing optimised growth soil mixture (N/P/K 14/16/18,
125 1.2 kg m^{-3} , Gramoflor SP1 Universel) and fertilised by adding 6-7g of slow-release nutrient
126 granules (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil, Boulogne-Billancourt, France). When
127 they reached maturity, plants were transferred into phytotronic chambers for ozone exposure.

128

129 To study the impact of day length on responses to ozone, experiments were conducted using two
130 different photoperiods. The first involved a short day (SD) photoperiod where light was maintained
131 only for 8 h (16h of dark). A second experiment was conducted with a longer photoperiod of 16 h
132 (8h of dark) with other conditions, including irradiance, identical to SD. Six phytotron chambers
133 were constantly ventilated with charcoal-filtered air. The O₃ treatment (350 ppb) was begun at the
134 end of a 7-day long acclimation period. O₃ was produced from pure O₂ with two ozone generators
135 (OZ500; Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) and injected
136 directly along with the filtered air entering the chambers. Control plants were exposed to ambient
137 filtered air. We used a set of automated systems and analysers (O341M; Environment S.A. Paris,
138 France) to monitor the concentrations and the length of O₃ exposure. Fumigation started 1 hour after
139 the beginning of the photoperiod. Ozone concentration was maintained at 350 ppb \pm 10 of O₃ for
140 7 hours (10:00 to 17:00). Two 7h fumigations were performed for plants in LD on consecutive
141 days. Because of the less severe symptoms observed compared to LD, an extra 7h fumigation was
142 given in SD. Plants were subjected to 24 h of recovery period after the final fumigation in both
143 photoperiods. Only material from mature leaves was collected. Samples were rapidly frozen in
144 liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Lesion area was quantified by imaging affected
145 areas of 6-8 plants of each type using IQmaterials software. Leaf areas (LA) were estimated using
146 ImageJ.

147

148 Enzyme assays

149 Protein extraction was performed according to Dghim *et al.* (2012) Total soluble proteins were
150 determined according to Wildhagen *et al.* (2010). Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Munich,
151 Germany) was used as a calibration standard. Enzymatic activities were assayed using a microplate
152 spectrophotometer (Biotek, PowerWave™ HT, USA). Duplicates of each leaf extract, from control
153 or O₃-treated chambers, were used to measure activities at 30°C. PEPC (EC 4.1.1.31) activity was
154 determined by monitoring NADH extinction at 340 nm according to the protocol described by
155 Fontaine *et al.* (1999). Protocols used to measure cytosolic NADP-dependent enzymatic activities
156 were based on NADPH formation at 340 nm. NADP-G6PDH (EC 1.1.1.49) activity was
157 determined following Pitel and Cheliak (1986), optimised for activity of the cytosolic isoform.
158 NADP-ME activity (EC 1.1.1.40) was determined according to Casati *et al.* (1997). ICDH (EC
159 1.1.1.42) activity was measured according to Gupta and Singh (1988). Cytosolic NADP-GAPDH
160 (EC 1.2.1.13) activity was assayed following Gómez Casati *et al.* (2000).

161

162 **Metabolite measurements**

163

164 Enzymatic assay of NAD(H), NADP(H), ascorbate, and glutathione was performed as previously
165 described (Queval and Noctor 2007). Salicylic acid was measured by HPLC-fluorescence as in
166 Chaouch *et al.* (2010).

167

168 **Transcript analysis**

169

170 RNA was extracted with Trizol and reverse transcribed with the SuperScript III First-Strand
171 Synthesis System (Invitrogen). qPCR analysis of PR1 cDNA was performed according to Queval *et*
172 *al.* (2007) using ACTIN2 as a constitutive control and the following primer combinations:

173 *PR1*: 5'AGGCTAACTACAACACTACGCTGCG-3' and

174 5'-GCTTCTCGTTCACATAATTCCCAC-3'

175 *ACTIN2*: 5'-CTGTACGGTAACATTGTGCTCAG-3' and

176 5'-CCGATCCAGACACTGTACTTCC-3'

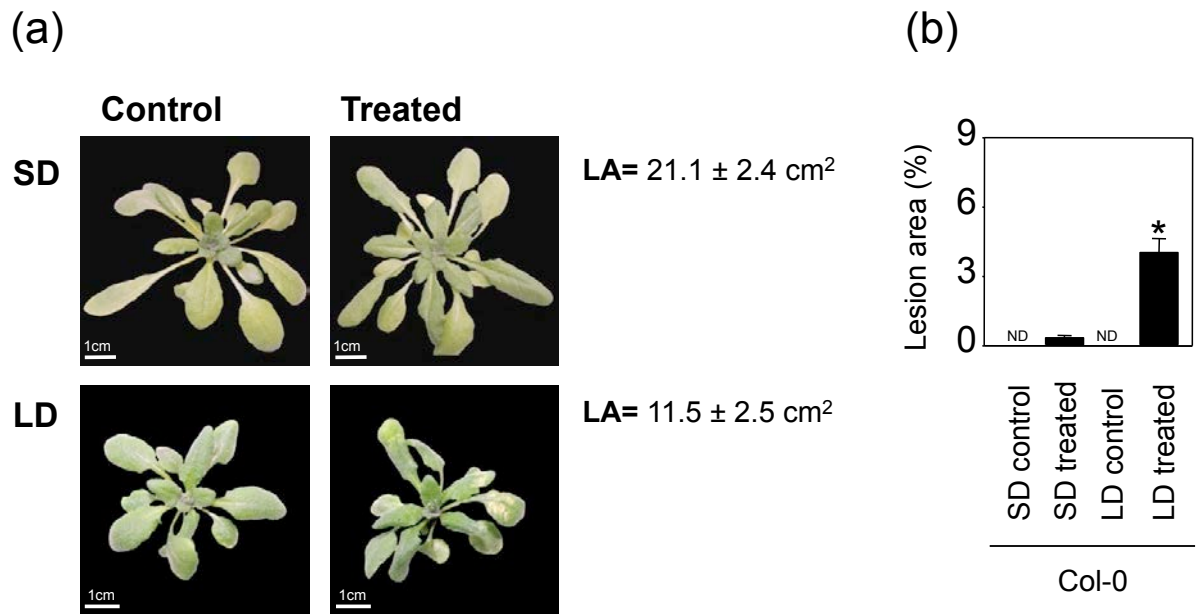
177

178 **Statistical analysis**

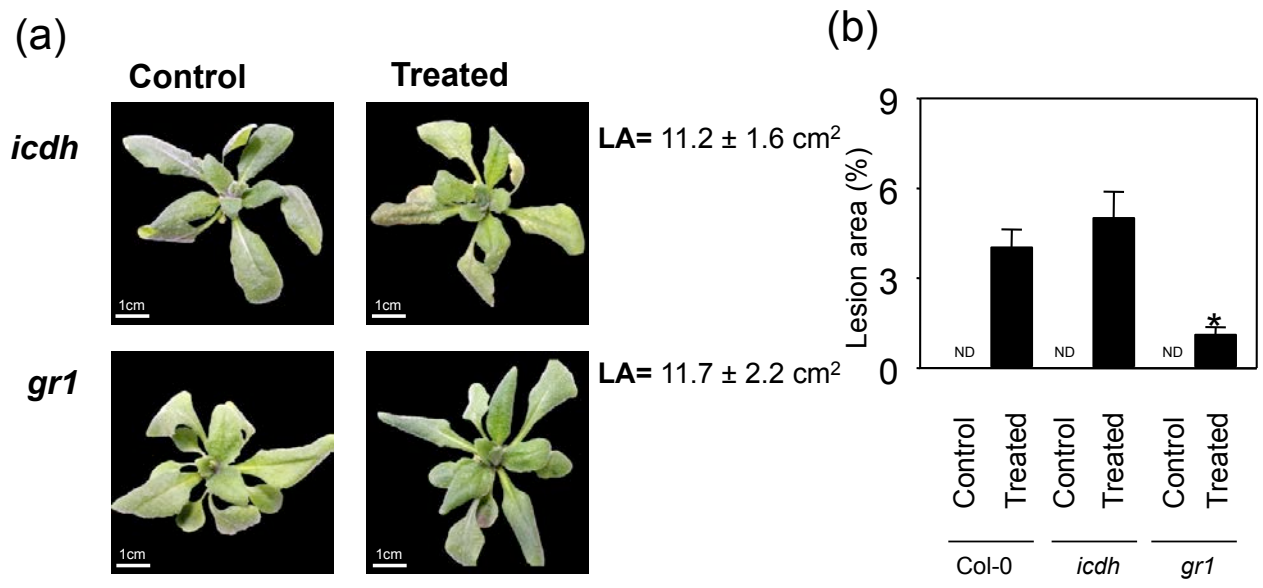
179

180 Unless otherwise stated, data are means \pm SE of at least three independent samples from different
181 plants, each sample corresponding to plants collected in control (3 chambers) or ozone chamber (3
182 chambers). The statistical analysis of data was based on Student's *t*-tests. Calculations were

183 performed on a minimum of three independent data sets, assuming two sample equal variance and a
184 two-tailed distribution. Unless stated otherwise, significant difference is expressed using *t*-test at *P*
185 < 0.05. Principal component analysis (PCA) of extractable enzyme activities was performed using
186 R (R Development Core Team 2011).



187 Figure 1. Photoperiod-dependent phenotypes of Col-0 equally treated with ozone (Black bars) in
 188 long days (LD, 16h photoperiod) and short days (SD, 8h photoperiod) condition. ND non-detected.
 189 LA, estimated leaf area. *Asterisks show significant differences at P value < 0.05.



190 Figure 2. Effects of *icdh* and *gr1* mutations on ozone-induced lesion formation in long days. *
 191 indicates significant differences of mutants relative to Col-0; + indicates significant differences of
 192 ozone-treated plants relative to controls in the same genotype; ∞ indicates significant differences of
 193 mutants relative to Col-0 in ozone condition and ○ indicates significant differences of ozone-treated
 194 mutants relative to Col-0 in the control condition. LA, estimated leaf area. Only P values < 0.05 are
 195 considered to be significant.

196 RESULTS

197

198 Effect of growth day length on responses of *Arabidopsis* Col-0 to ozone

199

200 Recent studies have implicated growth day length conditions as a significant factor in the response
201 to oxidative stress (Queval *et al.* 2007, 2011). We therefore tested whether growth photoperiod
202 could affect the sensitivity of Col-0 to O₃. In LD conditions, in response to two consecutive O₃
203 fumigations of 350 ppb for 7h, Col-0 showed widespread visible damage, especially on the upper
204 leaf surface located on the outer part of the rosette (Fig. 1a). Lesions appeared early after the first
205 fumigation as small white spots and spread extensively by the end of the second fumigation. In
206 extreme cases, affected surfaces evolved into a collapsed brownish tissue during the subsequent 24h
207 recovery period. By contrast, in SD, even after an extra day of equal-time O₃ exposure (350 ppb for
208 7h), Col-0 exhibited very little visible injury (Fig. 1a). Those injuries that could be observed in SD
209 were limited to small whitish spots that were much fewer in extent and number than those observed
210 already after two exposures in LD. Quantification of the lesions using imaging software showed
211 that the percentage of observable lesions was much higher in LD than in SD (Fig. 1b).

212

213 Phenotypic analysis of ozone responses in knockout mutants for cICDH and GR1

214

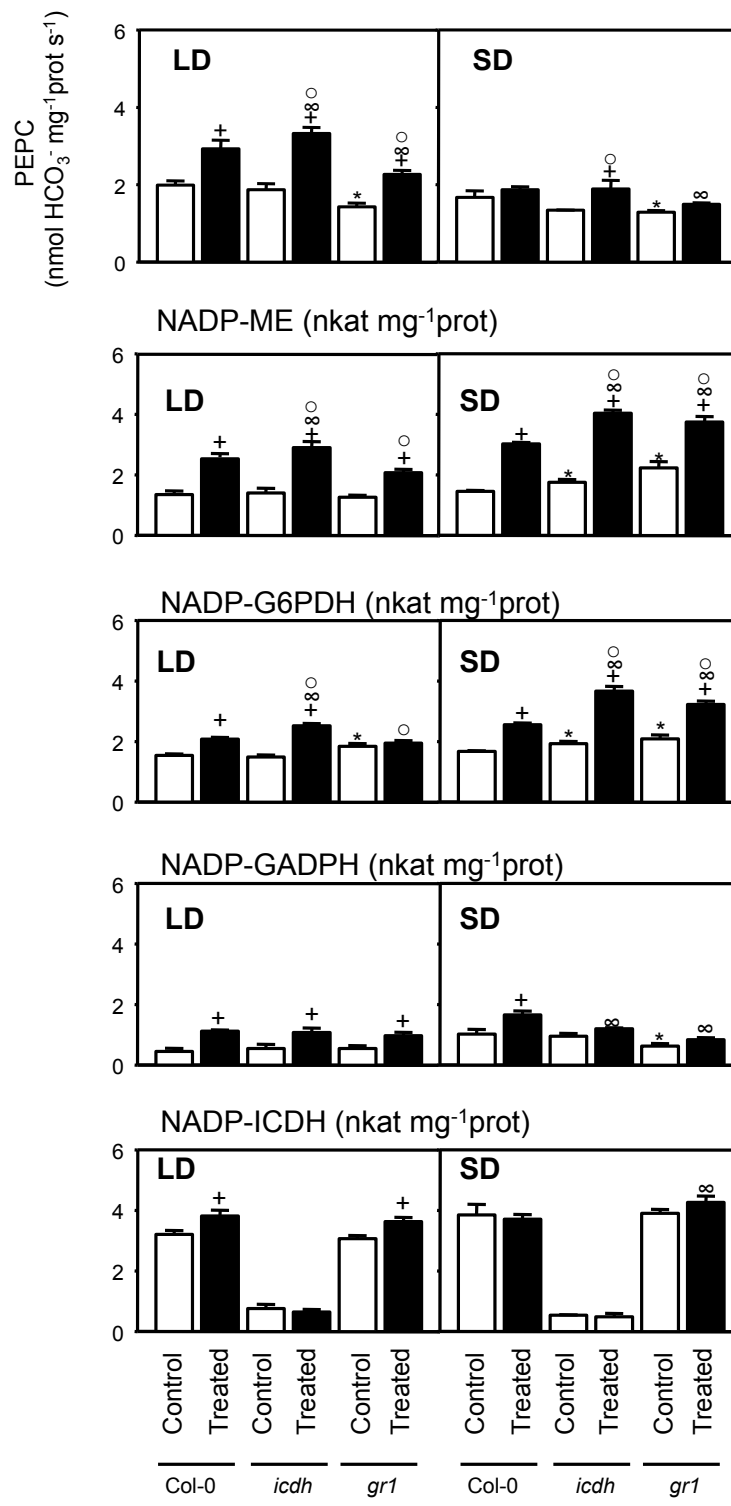
215 To investigate the specific influence of cICDH and GR1 in *Arabidopsis* responses to O₃, *icdh* and
216 *gr1* mutants were subjected to ozone treatment alongside the wild-type, Col-0. Similar to Col-0,
217 *icdh* and *gr1* showed very little lesion formation in SD (data not shown). When the same O₃
218 treatment was applied in LD growth conditions, *icdh* developed similar lesions to Col-0 whereas
219 lesion spread was significantly restricted in *gr1* (Fig. 2).

220

221 Analysis of PEPC and cytosolic NADPH generating enzymes

222

223 Studies in other species such as poplar have shown that respiratory enzymes are a key part of the
224 ozone response (Dizengremel 2001; Dizengremel *et al.* 2009; Dghim *et al.* 2012). These effects
225 may be related to the need for increased NADPH production, a general feature of responses to
226 oxidative stress (Foyer and Noctor 2009). Thus, we measured PEPC and the activities of four
227 NADP-linked dehydrogenases (ME, cICDH, G6PDH and GAPDH) that are potentially involved in
228 NADPH regeneration in response to O₃. The analyses were performed in all three genotypes (Col-0,
229 *gr1*, *icdh*) in both day length conditions.



230 Figure 3. Impact of ozone on extractable activity of PEPC NADP-dependent dehydrogenases in
 231 control (white blocks) and ozone-treated (black blocks) leaves of Col-0, *icdh*, and *gr1* in long days
 232 (LD, 16h photoperiod; left) or short days (SD, 8h photoperiod; right). * indicates significant
 233 differences of mutants relative to Col-0; + indicates significant differences of ozone-treated plants
 234 relative to controls in the same genotype; ∞ indicates significant differences of mutants relative to
 235 Col-0 in ozone condition and ∘ indicates significant differences of ozone-treated mutants relative to
 236 Col-0 in the control condition. Only *P* values < 0.05 are considered to be significant.

237 Although PEPC was similar in Col-0 and *icdh*, activity was slightly lower in *gr1* (Fig. 3). The
 238 activity responded differently to O₃ treatment in the two photoperiod conditions, with a much more
 239 marked stimulation in LD observed in all three genotypes (Fig. 3). Like PEPC, the extractable
 240 activities of the measured NADP-dehydrogenases were stimulated differentially by O₃ treatment
 241 (Fig. 3). Increases in NADP-ME and G6PDH activities were observed in all genotypes, and tended
 242 to be higher in SD compared to LD. Ozone stimulation was enhanced by the *icdh* mutation (in both
 243 LD and SD) and by the *gr1* mutation in SD. In LD, NADP-GADPH activity was stimulated for all
 244 three genotypes even if the level of activity remained low compared to the other NADP-
 245 dehydrogenases. In SD, the stimulation of this enzyme was only significant for Col-0. The ICDH
 246 activity was also stimulated by O₃ treatment in Col-0 and *gr1* grown in LD, but not in SD. These
 247 assays also confirmed the drastically decreased extractable ICDH activity in the *icdh* mutant
 248 (Mhamdi *et al.* 2010b). While the data of Figure 4 do not provide evidence for a strong induction of
 249 other NADP-linked enzymes in *icdh* in optimal conditions, they do suggest that the absence of the
 250 major leaf ICDH reinforces the ozone inducibility of NADP-ME and G6PDH activities, especially
 251 in SD conditions.

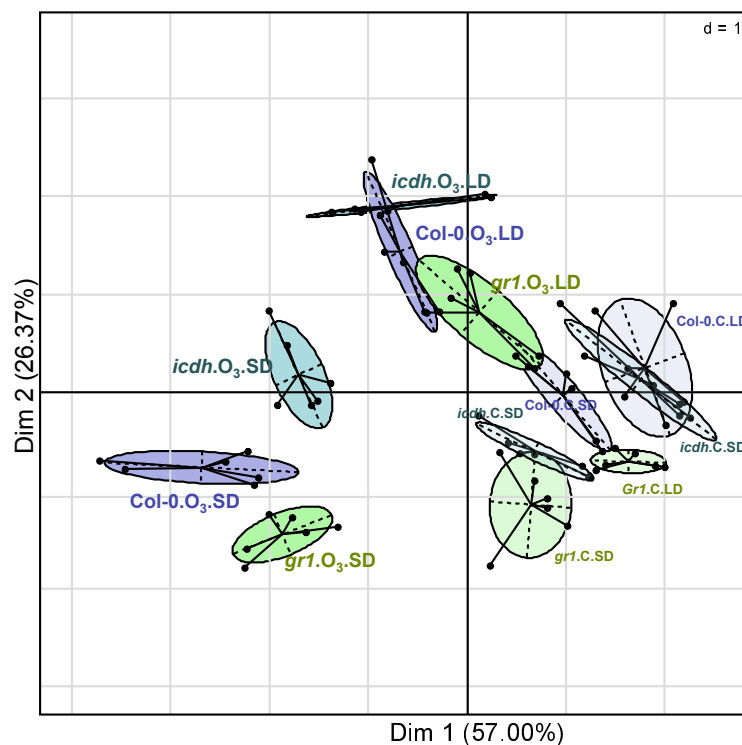
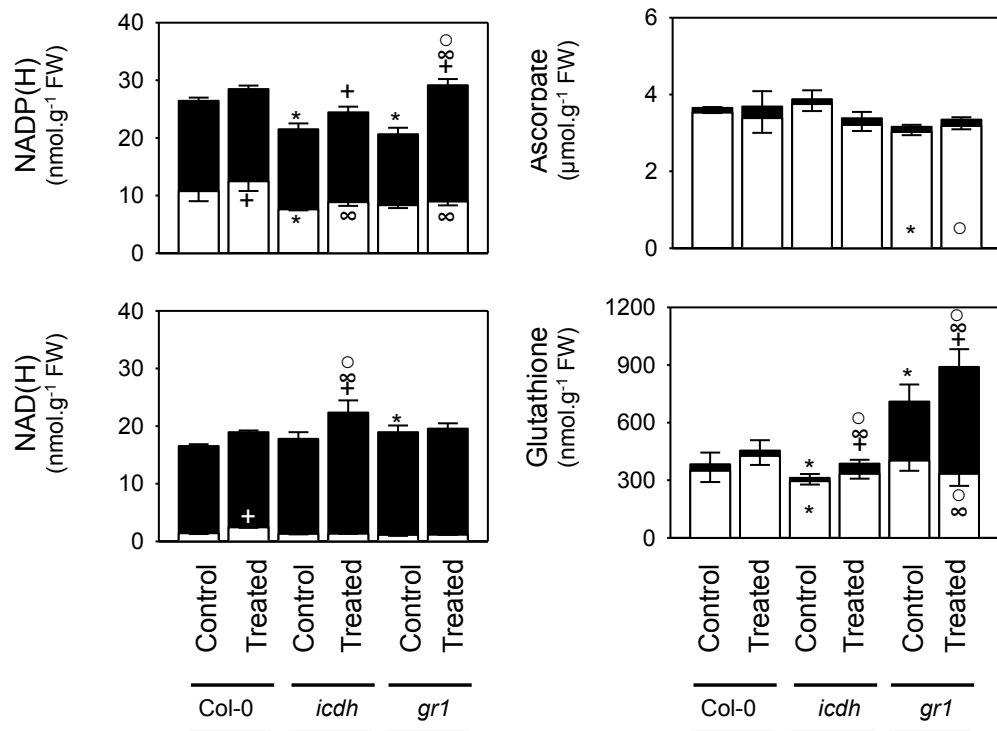


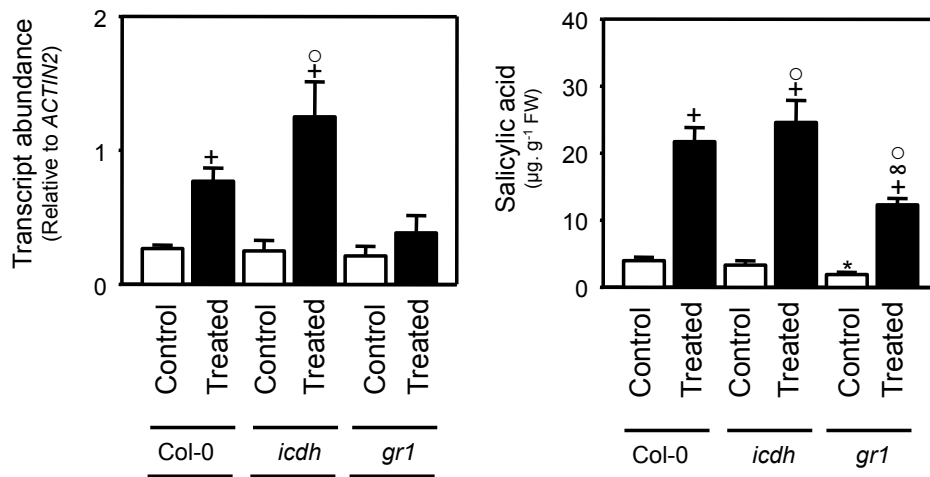
Figure 4. Principal component analysis of five enzymatic activities showing differential response with respect to conditions. Enzymes measured were PEPC, G6PDH, NADP-ME, and NADP-GADPH. The distances between these populations were calculated as described in the materials and methods, using R stat development.

We attempted to use the activity data to analyze whether genotype or photoperiod significantly modulated the biochemical response of *Arabidopsis* to O₃. Principal Components Analysis of the enzyme

269 activity profiles allowed separation of genotype, O₃, and photoperiod effects (note that NADP-
 270 ICDH activity data was excluded because of the genetic decrease in the *icdh* mutant).



271 Figure 5. Contents of pyridine nucleotide, ascorbate and glutathione in control (white blocks) and
 272 ozone-treated (black blocks) of Col-0, *icdh*, and *gr1* in long days. White blocks, reduced forms.
 273 Black blocks, oxidized forms. * indicates significant differences of mutants relative to Col-0 in
 274 control condition; + indicates significant differences of ozone-treated plants relative to controls in
 275 the same genotype; ∞ indicates significant differences of mutants relative to Col-0 in ozone
 276 condition and ∘ indicates significant differences of ozone-treated mutants relative to Col-0 in the
 277 control condition. Only *P* values < 0.05 are considered to be significant. The differences are shown
 278 in the bottom of the blocks for the total ascorbate or glutathione and in the top for GSSG.



279 Figure 6. Quantitative RT-PCR analysis of *P1* transcripts and SA contents in Col-0 and mutants. *
 280 indicates significant differences of mutants relative to Col-0; + indicates significant differences of
 281 ozone-treated plants relative to controls in the same genotype; ∞ indicates significant differences of
 282 mutants relative to Col-0 in ozone condition and ∘ indicates significant differences of ozone-treated
 283 mutants relative to Col-0 in the control condition. Only *P* values < 0.05 are considered to be
 284 significant.

285 Separation between populations was distributed following two main axes. A horizontal axis
286 separated the experimental group according to treatment and explained 57 % of the variability (Fig.
287 5). This separation occurred for all the genotypes except for *gr1* grown in LD. The second axis
288 separates the experimental group according to day length and explained 26.4 % of the variability
289 (Fig. 4). Same separation was also obtained on the basis of genotype and day length in samples
290 exposed to O₃, ie, replicate samples tended to cluster together (Fig. 4). Thus, these enzyme
291 activities define a biochemical signature that is affected by O₃ and by day length, and also by the
292 presence or absence of GR1 and ICDH expression.

293

294 **Redox and defence responses to ozone in *icdh* and *gr1***

295

296 The impact of ozone on major redox couples was studied in Col-0, *icdh*, and *gr1*. Given the lack of
297 phenotypic response to ozone observed in SD (Fig. 1), we focused on analysis of effects of *icdh* and
298 *gr1* in LD. In agreement with previous data (Mhamdi *et al.* 2010a, 2010b), neither *gr1* nor *icdh1*
299 showed strongly altered pyridine nucleotide pools in control conditions (Fig. 5, Table 1). Further,
300 both total pools and redox states were relatively unaffected by O₃ exposure (Fig. 5, Table 1).
301 Similarly, ascorbate status was little affected by either genotype or treatment (Fig. 5, Table 1).
302 Whereas O₃ treatment increased glutathione reduction state slightly in Col-0, glutathione became
303 more oxidized in *icdh* under O₃ (Table 1). The most dramatic effect was observed for glutathione in
304 *gr1*. Already significantly more oxidized than in Col-0 or *icdh* in control conditions, glutathione
305 reduction state dropped below 50% following O₃ treatment (Table 1). This pronounced oxidation
306 was accompanied by accumulation of total glutathione so that O₃-treated *gr1* had more than twice
307 as much glutathione as O₃-treated Col-0.

308

309 Giving the lesions induced by O₃ treatment in LD (Fig. 1), we analysed whether this phenotype was
310 related to the SA pathway and, if so, whether this pathway was affected by the mutations. Analysis
311 of the SA signalling marker *PR1* showed that this gene was induced about three times by O₃
312 treatment of Col-0 (Fig. 6, top). A stronger effect was observed in *icdh*, whereas in *gr1* induction of
313 *PR1* by O₃ was much decreased and not statistically significant (Fig. 6, top). *PR1* induction by O₃
314 was associated with SA accumulation: whereas Col-0 and *icdh* accumulated SA to similar levels, O₃
315 treatment triggered less SA in *gr1*, which also had lower basal levels in the control condition
316 (Fig. 6)

317 Table 1. Redox states of pyridine nucleotides, ascorbate and glutathione in control and ozone-
 318 treated conditions in Col-0 and mutants. Redox states are given as % reduced form \pm SE.
 319 Asterisks indicate significant effect of ozone treatment relative to control. *a* indicates significant
 320 differences of *icdh* or *gr1* relative to Col-0 in the same condition (t test, $P < 0.05$).

| | | Control | Ozone |
|-------------|--------------|-----------------------------|------------------------------|
| NADP(H) | Col-0 | 40.0 \pm 5.6 | 43.4 \pm 6.9 |
| | <i>icdh1</i> | 35.6 \pm 4.1 | 36.1 \pm 1.4 |
| | <i>gr1</i> | 40.6 \pm 5.7 | 30.7 \pm 3.2 ^{*a} |
| NAD(H) | Col-0 | 8.4 \pm 0.7 | 13 \pm 0.72 ^{***} |
| | <i>icdh1</i> | 7.2 \pm 1.0 | 5.9 \pm 0.9 ^a |
| | <i>gr1</i> | 5.9 \pm 1.0 | 5.9 \pm 0.9 ^a |
| Ascorbate | Col-0 | 96.6 \pm 0.8 | 91.8 \pm 0.7 [*] |
| | <i>icdh</i> | 96.9 \pm 1.2 | 94.9 \pm 0.9 ^a |
| | <i>gr1</i> | 95.6 \pm 1.0 | 95.1 \pm 1.7 |
| Glutathione | Col-0 | 90.8 \pm 0.9 | 94.2 \pm 0.7 [*] |
| | <i>icdh</i> | 94.3 \pm 1.5 | 86.0 \pm 2.0 ^{*a} |
| | <i>gr1</i> | 56.6 \pm 0.8 ^a | 36.9 \pm 3.0 ^{*a} |

DISCUSSION

322

Responses of *Arabidopsis* Col-0 to O₃ are influenced by growth photoperiod conditions

324

325 The primary objective of the present study was to examine the influence of cytosolic ICDH and
326 GR1 in ozone responses. Because of growing interest in interactions between day length and
327 oxidative stress, we performed initial phenotypic analyses in SD and LD photoperiods. We
328 therefore subjected plants to identical exposures to O₃ (350 ppb for 7h) during light periods of 8h or
329 16h. In all three genotypes, including Col-0, our analysis revealed that LD conditions led to
330 extended lesions. Early symptoms were already visible after the first fumigation, and developed
331 more extensively after an additional O₃ fumigation and following 24h recovery. By comparison,
332 identical O₃ treatments in SD did not induce visible lesions at this time, and even after a further day
333 of treatment, only slight symptoms were apparent. Different non-exclusive hypotheses may explain
334 the differential effect of O₃ in LD and SD. First, although the duration of O₃ exposure was the same
335 in LD and SD days, the additional exposure to light (in the absence of O₃) in LD could produce
336 additional signals necessary to trigger lesion formation. Such a hypothesis was advanced to explain
337 differential responses in a catalase-deficient mutant in SD and LD (Queval *et al.* 2007). Indeed, it
338 has been reported that ROS accumulation is enhanced by acclimation to SD (Lepistö & Rintamäki
339 2011; Michelet & Krieger-Liszky 2011). A second related hypothesis, previously formulated to
340 explain a higher sensitivity in Nordic climatic conditions (Pleijel *et al.* 2000; De Temmerman *et al.*
341 2002) is that the dark period of recovery could be key, possibly explaining higher sensitivity in LD.
342 A third factor could be changes in stomatal density (number of stomata per leaf area), which have
343 been reported to be higher in *Arabidopsis* in LD conditions (Lepistö *et al.* 2009). Thus, in
344 opposition to SD conditions, gas exchange through stomata would be amplified under LD,
345 favouring the entry of O₃ into the sub-stomatal cavity. Finally, the plant developmental programme
346 is different in SD and LD. *Arabidopsis* may therefore be configured to induce lesions in response to
347 O₃ more strongly in LD. Indeed, recent data suggest that oxidative stress triggers different
348 transcriptomic signatures in LD and SD, with an enhanced response of antioxidative and
349 detoxifying systems in SD (Queval *et al.* 2011). Although defining the mechanisms underlying the
350 photoperiod-linked effect will require further work, our data suggest that growth day length could
351 be an important factor to take into account in studies of plant responses to O₃.

352

Maintenance of glutathione status during O₃ exposure is GR1-dependent

354

355 Because O₃ poses an initial stress in the apoplast, cytosolic antioxidative enzymes are likely the first
356 line of intracellular defence against the resulting increased ROS. The ascorbate-glutathione pathway
357 is a key player, and this sequence of reactions depends on GR and enzymes that supply NADPH for
358 GR and other activities that require reductant. Our measurements of ascorbate revealed minor or
359 negligible changes in content and redox state in response to O₃, although we cannot discount
360 possible changes in ascorbate compartmentation. Indeed, while ascorbate-deficient *Arabidopsis*
361 mutants demonstrate that this compound can influence O₃ resistance (Conklin & Barth 2004), the
362 role of this metabolite in ozone scavenging in this compartment is still under debate, and the
363 apoplastic pool is thought to be a key factor (D'Haese *et al.* 2005; Yoshida *et al.* 2006). Several
364 studies have reported that O₃ treatment causes an accumulation of glutathione, predominantly as
365 GSSG (Gupta, Alscher & McCune 1991; Bick *et al.* 2001).

366
367 Our O₃ treatment conditions did not trigger glutathione oxidation in Col-0. Likewise, the pyridine
368 nucleotides were not strongly affected. This suggests that in Col-0, antioxidative enzymes can
369 operate effectively to maintain intracellular redox homeostasis, even under conditions in which
370 lesions are forming. Because of the multiplicity of genes encoding the antioxidative network
371 (Mittler *et al.* 2004), the role of specific enzymes remains unclear. As we now discuss, our
372 observations highlight significant roles for cICDH and, particularly, GR1.

373
374 In *Arabidopsis*, *GRI* is the only gene encoding a specific cytosolic GR, and also encodes a minor
375 peroxisomal activity (Kataya & Reumann 2010). A second gene, *GR2*, encodes a dual-targeted
376 chloroplast/mitochondrial isoform, whereas NADPH-thioredoxin systems can also provide a back-
377 up reduction of GSSG in the cytosol (Marty *et al.* 2009). However, the *gr1* mutation cannot be
378 adequately replaced by either of these systems when introduced into a catalase-deficient mutant,
379 *cat2* (Mhamdi *et al.* 2010a). Our analyses show that GR1 is involved in the O₃ response. First,
380 similar to effects observed in *cat2*, the absence of this enzyme caused enhanced glutathione
381 oxidation and accumulation (Fig. 6). Together with the decreased resistance of *gr1* to pathogenic
382 bacteria (Mhamdi *et al.* 2010a), this shows that the role of GR1 in oxidative stress-linked responses
383 is not restricted to the *cat2* background, in which initial oxidation is peroxisomal. Thus, although
384 GR1 is dispensable for growth under optimal conditions, it cannot be replaced under conditions of
385 oxidative stress. Intriguingly, however, loss of *GRI* function did not aggravate lesion formation.
386 Rather, lesion extent was repressed (discussed further below).

387

388 **Overlap between cytosolic NADPH-producing enzymes in the ozone response**

389 Previous studies have established that O₃ exposure triggers changes in respiration (Dizengremel *et*
390 *al.* 2008, 2009, 2012). Here, we show that the extractable activities of several respiratory enzymes
391 showed a general increase in *Arabidopsis* leaves exposed to O₃. Among the NADP-linked
392 dehydrogenases, the clearest increases were observed for NADP-ME and NADP-G6PDH. In
393 general, these increases were not greatly affected by the day length. In contrast, increases in PEPC
394 were much clearer in LD, conditions in which lesions rapidly appeared. Ozone-induced increases in
395 PEPC activity have been related to enhancement of both protein and transcripts (Dizengremel *et al.*
396 2009; Matyssek *et al.* 2006). Increases in all these enzymes could be related to the greater demand
397 for NADPH and NADH, and thus contribute to the stability of these key redox pools under O₃ (Fig.
398 6). In agreement with the relatively minor induction of ICDH in Col-0, the functional analysis we
399 report here for the *icdh* mutant suggests that this enzyme plays a relatively minor role in
400 determining O₃ resistance at the phenotypic level (Fig. 1). Indeed, although the total pool was
401 slightly decreased by loss of ICDH function, NADP(H) redox status was not changed. This stability
402 may have been the result of compensatory increases in G6PDH and NADP-ME, both of which were
403 stronger in *icdh* than in Col-0. Despite this, O₃ caused an oxidation of glutathione in *icdh* whereas
404 this was not observed in Col-0. Thus, we conclude that the NADP-linked dehydrogenases are partly
405 but not completely redundant in the O₃ response. On the basis of the strength of their increase,
406 NADP-ME and G6PDH could be key players, although this conclusion remains correlative and the
407 importance of these enzymes will need to be confirmed by similar functional studies to those we
408 report here for *icdh* and *gr1*.

409

410 **GR1 function is required for O₃-induced salicylic acid responses**

411

412 Ozone exposure is known to induce signaling through several phytohormone pathways, in
413 particular SA. While SA is needed to induce defence response under ozone treatment, elevated SA
414 promotes cell death (Rao *et al.* 2000; Overmyer *et al.* 2005; Yoshida *et al.* 2009). Even though O₃-
415 induced lesions in *icdh* were not significantly different from wild-type, *PRI* induction was
416 enhanced by this mutation. This is in agreement with a previous report that *icdh* enhances *PR* gene
417 expression in response to pathogens as in the O₃ response (Fig. 7), we also found that enhanced *PR*
418 gene expression was not associated with enhanced SA accumulation (Mhamdi *et al.* 2010b).
419 Perhaps the most striking of our observations is that the *gr1* mutation, despite causing enhanced
420 glutathione oxidation, down-regulated lesion formation, an effect that was associated with
421 decreased O₃-triggered SA accumulation and *PRI* gene expression. It was previously reported that
422 induction of *PR* genes by catalase deficiency is decreased by the *gr1* mutation, and that *gr1* has

423 lower basal levels of SA and bacterial resistance than Col-0 (Mhamdi *et al.* 2010a). Thus, the
424 present data provide further evidence that this enzyme plays an important role in stress conditions.
425 One possibility is that *gr1* affects activation of the thiol-regulated protein, NPR1. However, any
426 such effect is not in itself expected to compromise SA accumulation, which is stimulated by
427 absence of NPR1 function (Zhang *et al.* 2003). A recent genetic analysis has reported that
428 glutathione status plays an important role in linking intracellular H₂O₂ to SA accumulation, but that
429 oxidative stress can also induce SA-independent phenotypes (Han *et al.* 2012). One possibility is
430 that the *gr1* mutation suppresses SA-dependent responses and induces alternative oxidative stress
431 responses, as observed in a *cat2 gr1* double mutant (Han *et al.* 2012).

432

433 **Conclusions**

434

435 The present report reveals a significant influence for growth day length conditions in determining
436 the phenotypic outcome of *Arabidopsis* exposed to O₃. If this observation is of general relevance to
437 other species, it could be an important factor to take into account in evaluating the impact of O₃
438 and, perhaps, other pollutants on plants. While loss of cICDH function did not markedly affect the
439 response of *Arabidopsis* to O₃, this may reflect redundancy with other cytosolic NADPH-producing
440 enzymes. Indeed, it is noteworthy that some of these other enzymes were more strongly up-
441 regulated in *icdh* than in Col-0. Unlike *icdh*, the *gr1* mutation strongly influenced the response to
442 O₃ at phenotypic and biochemical levels, associated with compromised responses of the SA
443 pathway. As revealed by the surprisingly decreased (rather than increased) lesions in *gr1*, the roles
444 of specific enzymes are not necessarily easy to predict based on current concepts of relationships
445 between the antioxidative system and O₃. Our study therefore opens up interesting perspectives for
446 further targeted studies of specific genes encoding redox-homeostatic enzymes in governing O₃
447 sensitivity.

448

449 **ACKNOWLEDGMENTS**

450

451 We thank the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory for providing the sequence-indexed
452 *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants and the Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre, UK, for
453 supply of seed stocks. This work was partly funded by the French Agence Nationale de la
454 Recherche project “Vulnoz”.

455 REFERENCES

- 456 Ahsan N., Nanjo Y., Sawada H., Kohno Y. & Komatsu S. (2010) Ozone stress - induced proteomic
457 changes in leaf total soluble and chloroplast proteins of soybean reveal that carbon
458 allocation is involved in adaptation in the early developmental stage. *Proteomics*, **10**, 2605-
459 2619.
- 460 Ashmore M.R. (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell &*
461 *Environment*, **28**, 949-964.
- 462 Bagard M., Le Thiec D., Delacote E., Hasenfratz-Sauder M.-P., Banvoy J., Gérard J., Dizengremel
463 P. & Jolivet Y. (2008) Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of
464 hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiologia Plantarum*,
465 **134**, 559-574.
- 466 Barth C., De Tullio M. & Conklin P.L. (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering
467 time and the onset of senescence. *Journal of experimental botany*, **57**, 1657-1665.
- 468 Bick J.A., Setterdahl A.T., Knaff D.B., Chen Y., Pitcher L.H., Zilinskas B.A. & Leustek T. (2001)
469 Regulation of the plant-type 5'-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress. *Biochemistry*,
470 **40**, 9040-9048.
- 471 Booker F., Muntifering R., McGrath M., Burkey K., Decoteau D., Fiscus E., Manning W., Krupa
472 S., Chappelka A. & Grantz D. (2009) The ozone component of global change: potential
473 effects on agricultural and horticultural plant yield, product quality and interactions with
474 invasive species. *Journal of Integrative Plant Biology*, **51**, 337-351.
- 475 Casati P., Spampinato C.P. & Andreo C.S. (1997) Characteristics and physiological function of
476 NADP-malic enzyme from wheat. *Plant and cell physiology*, **38**, 928-934.
- 477 Castagna A. & Ranieri A. (2009) Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake
478 to gene expression adjustment. *Environmental Pollution Special Issue Section: Ozone and*
479 *Mediterranean Ecology: Plants, People, Problems*, **157**, 1461-1469.
- 480 Chaouch S., Queval G., Vanderauwera S., Mhamdi A., Vandorpe M., Langlois-Meurinne M., Van
481 Breusegem F., Saindrenan P. & Noctor G. (2010) Peroxisomal hydrogen peroxide is
482 coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE1 in a daylength-
483 related manner. *Plant physiology*, **153**, 1692-1705.
- 484 Conklin P.L. & Barth C. (2004) Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the
485 response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell &*
486 *Environment*, **27**, 959-970.
- 487

- 488 D'Haese D., Vandermeiren K., Asard H.A.N. & Horemans N. (2005) Other factors than apoplastic
489 ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of *Trifolium repens* L.
490 *Plant, Cell & Environment*, **28**, 623-632.
- 491 De Temmerman L., Karlsson G.P., Donnelly A., Ojanperä K., Jäger H.J., Finnan J. & Ball G.
492 (2002) Factors influencing visible ozone injury on potato including the interaction with
493 carbon dioxide. *European Journal of Agronomy*, **17**, 291-302
- 494 Dghim A.A., Dumont J., Hasenfratz-Sauder M.P., Dizengremel P., Thiec D.L. & Jolivet Y. (2012)
495 Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in ozone
496 sensitivity. *Physiologia Plantarum*.
- 497 Dizengremel P., Le Thiec D., Bagard M. & Jolivet Y. (2008) Ozone risk assessment for plants:
498 Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution*,
499 **156**, 11-15.
- 500 Dizengremel P., Le Thiec D., Hasenfratz-Sauder M.-P., Vaultier M.-N., Bagard M. & Jolivet Y.
501 (2009) Metabolic-dependent changes in plant cell redox power after ozone exposure. *Plant*
502 *Biology*, **11**, 35-42.
- 503 Dizengremel P., Sasek T.W., Brown K.J. & Richardson C.J. (1994) Ozone-Induced Changes in
504 Primary Carbon Metabolism Enzymes of Loblolly Pine Needles. *Journal of Plant*
505 *Physiology*, **144**, 300-306.
- 506 Dizengremel P., Vaultier M.-N., Le Thiec D., Cabané M., Bagard M., Gérard D., Gérard J., Dghim
507 A.A., Richet N., Afif D., Pireaux J.-C., Hasenfratz-Sauder M.-P. & Jolivet Y. (2012)
508 Phosphoenolpyruvate is at the crossroads of leaf metabolic responses to ozone stress. *New*
509 *Phytologist*, **195**, 512-517.
- 510 Ernst D., Schraudner M., Langebartels C. & Sandermann H. (1992) Ozone-induced changes of
511 mRNA levels of β -1, 3-glucanase, chitinase and 'pathogenesis-related' protein 1b in tobacco
512 plants. *Plant molecular biology*, **20**, 673-682.
- 513 Fontaine V., Pelloux J., Podor M., Afif D., Gérard D., Grieu P. & Dizengremel P. (1999) Carbon
514 fixation in *Pinus halepensis* submitted to ozone. Opposite response of ribulose-1,5-
515 bisphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase. *Physiologia*
516 *Plantarum*, **105**, 187-192.
- 517 Foyer C.H. & Noctor G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling,
518 acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, **11**, 861-905.

- 519 Foyer C.H. & Noctor G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant*
520 *physiology*, **155**, 2-18.
- 521 Gómez Casati D.F., Sesma J.I. & Iglesias A.A. (2000) Structural and kinetic characterization of
522 NADP-dependent, non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from
523 celery leaves. *Plant Science*, **154**, 107-115.
- 524 Gupta A.S., Alscher R.G. & McCune D. (1991) Response of photosynthesis and cellular
525 antioxidants to ozone in Populus leaves. *Plant physiology*, **96**, 650.
- 526 Gupta V.K. & Singh R. (1988) Partial purification and characterization of NADP⁺-isocitrate
527 dehydrogenase from immature pod walls of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant*
528 *physiology*, **87**, 741-741.
- 529 Han Y., Chaouch S., Mhamdi A., Queval G., Zechmann B. & Noctor G. (2012) Glutathione links
530 H₂O₂ to activation of salicylic acid and signaling independently of its antioxidant function
531 or NPR1 in *Arabidopsis*. *Antioxidants & Redox Signaling*, (accepted subject to revision).
- 532 Kataya A.R.A. & Reumann S. (2010) *Arabidopsis* glutathione reductase 1 is dually targeted to
533 peroxisomes and the cytosol. *Plant signaling & behavior*, **5**, 171-175.
- 534 Laisk A., Kull O. & Moldau H. (1989) Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close
535 to zero. *Plant Physiology*, **90**, 1163-1163.
- 536 Lepistö A., Kangasjärvi S., Luomala E.M., Brader G., Sipari N., Keränen M., Keinänen M. &
537 Rintamäki E. (2009) Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with
538 photoperiodic development in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, **149**, 1261-1276.
- 539 Lepistö A. & Rintamäki E. (2011) Coordination of Plastid and Light Signaling Pathways upon
540 Development of *Arabidopsis* Leaves under Various Photoperiods. *Molecular Plant*.
- 541 Marty L., Siala W., Schwarzländer M., Fricker M.D., Wirtz M., Sweetlove L.J., Meyer Y., Meyer
542 A.J., Reichheld J.P. & Hell R. (2009) The NADPH-dependent thioredoxin system
543 constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in *Arabidopsis*.
544 *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 9109-9114.
- 545 Matyssek R., Wieser G., Calfapietra C., de Vries W., Dizengremel P., Ernst D., Jolivet Y.,
546 Mikkelsen T.N., Mohren G.M.J., Le Thiec D., Tuovinen J.P., Weatherall A. & Paoletti E.
547 (2012) Forests under climate change and air pollution: Gaps in understanding and future
548 directions for research. *Environmental Pollution*, **160**, 57-65
- 549 Matyssek R., Le Thiec D., Low M., Dizengremel P., Nunn A.J. & Haberle K.H. (2006) Interactions
550 between drought and O₃ stress in forest trees. *Plant Biol (Stuttg)*, **8**, 11-17.
- 551 Mhamdi A., Hager J., Chaouch S., Queval G., Han Y., Tacconnat L., Saindrenan P., Gouia H.,
552 Issakidis-Bourguet E., Renou J.P. & Noctor G. (2010a) *Arabidopsis* GLUTATHIONE

- 553 REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in
554 ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid
555 signaling pathways. *Plant physiology*, **153**, 1144-1160.
- 556 Mhamdi A., Mauve C., Gouia H., Saindrenan P., Hodges M. & Noctor G. (2010b) Cytosolic
557 NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the
558 regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell & Environment*, **33**,
559 1112-1123.
- 560 Michelet L. & Krieger-Liszkay A. (2011) Reactive oxygen intermediates produced by
561 photosynthetic electron transport are enhanced in short-day grown plants. *Biochimica et*
562 *Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*.
- 563 Mills G., Hayes F., Simpson D., Emberson L., Norris D., Harmens H. & Büker P. (2011) Evidence
564 of widespread effects of ozone on crops and (semi-) natural vegetation in Europe (1990–
565 2006) in relation to AOT40-and flux-based risk maps. *Global Change Biology*, **17**, 592-613.
- 566 Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. & Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene
567 network of plants. *Trends in plant science*, **9**, 490-498.
- 568 Noctor G. (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox
569 couples. *Plant, cell & environment*, **29**, 409-425.
- 570 Overmyer K., Brosché M., Pellinen R., Kuittinen T., Tuominen H., Ahlfors R., Keinänen M.,
571 Saarma M., Scheel D. & Kangasjärvi J. (2005) Ozone-induced programmed cell death in the
572 *Arabidopsis* radical-induced cell death1 mutant. *Plant Physiology*, **137**, 1092-1104.
- 573 Pell E., Eckardt N. & Enyedi A. (1992) Timing of ozone stress and resulting status of ribulose
574 biphosphate carboxylase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytologist*,
575 **120**, 397-405.
- 576 Pitel J.A. & Cheliak W.M. (1986) Effectiveness of protective agents for increasing activity of five
577 enzymes from vegetative tissues of white spruce. *Canadian journal of botany*, **64**, 39-44.
- 578 Pleijel H., Danielsson H., Karlsson G.P., Gelang J., Karlsson P.E. & Sellden G. (2000) An ozone
579 flux-response relationship for wheat. *Environmetal Pollution*, **109**, 453-462.
- 580 Plöchl M., Lyons T., Ollerenshaw J. & Barnes J. (2000) Simulating ozone detoxification in the leaf
581 apoplast through the direct reaction with ascorbate. *Planta*, **210**, 454-467.
- 582 Queval G., Issakidis - Bourguet E., Hoeberichts F.A., Vandorpe M., Gakiere B., Vanacker H.,
583 Miginiac - Maslow M., Van Breusegem F. & Noctor G. (2007) Conditional oxidative stress
584 responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant cat2 demonstrate that redox state is a
585 key modulator of daylength - dependent gene expression, and define photoperiod as a

- 586 crucial factor in the regulation of H₂O₂ - induced cell death. *The Plant Journal*, **52**, 640-657.
- 587 Queval L G., Neukermans J., Vanderauwera S., Van Breusegem F. & NOCTOR G. (2011) Day
588 length is a key regulator of transcriptomic responses to both CO₂ and H₂O₂ in *Arabidopsis*.
589 *Plant, Cell & Environment*, **35**, 374-387.
- 590 Queval G. & Noctor G. (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP,
591 glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during
592 *Arabidopsis* rosette development. *Analytical biochemistry*, **363**, 58-69.
- 593 Rao M.V. & Davis K.R. (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in
594 *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J*, **17**, 603-614.
- 595 Rao M.V., Lee H., Creelman R.A., Mullet J.E. & Davis K.R. (2000) Jasmonic acid signaling
596 modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell*, **12**, 1633-1646.
- 597 Sharma Y.K., Leon J., Raskin I. & Davis K.R. (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis*
598 *thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and
599 induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 5099.
- 600 Smirnoff N. & Pallanca J.E. (1996) Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress.
601 *Biochemical Society Transactions*, **24**, 472-478.
- 602 R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. *R*
603 *Foundation for Statistical Computing Vienna Austria*. ISBN 3-900051-07-0, URL
604 <http://www.R-project.org/>
- 605 Vingarzan R. (2004) A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric*
606 *Environment*, **38**, 3431-3442.
- 607 Vollsnes A.V., Eriksen A.B., Otterholt E., Kvaal K., Oxaal U. & Futsaether C.M. (2009) Visible
608 foliar injury and infrared imaging show that daylength affects short-term recovery after
609 ozone stress in *Trifolium subterraneum*. *Journal of experimental botany*, **60**, 3677-3686.
- 610 Wildhagen H., Dürr J., Ehltling B. & Rennenberg H. (2010) Seasonal nitrogen cycling in the bark of
611 field-grown Grey poplar is correlated with meteorological factors and gene expression of
612 bark storage proteins. *Tree physiology*, **30**, 1096-1110.
- 613 Yoshida S., Tamaoki M., Ioki M., Ogawa D., Sato Y., Aono M., Kubo A., Saji S., Saji H., Satoh S.
614 & Nakajima N. (2009) Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone-
615 exposed *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, **136**, 284-298.
- 616 Yoshida S., Tamaoki M., Shikano T., Nakajima N., Ogawa D., Ioki M., Aono M., Kubo A.,
617 Kamada H., Inoue Y. *et al.* (2006) Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for
618 ozone tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology*, **47**, 304-308.

619 Zhang Y., Goritschnig S., Dong X. & Li X. (2003) A gain-of-function mutation in a plant disease
620 resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways
621 in suppressor of npr1-1, constitutive 1. *The Plant Cell Online*, **15**, 2636-2646.

6. CHAPITRE N°3 : Contrôle du métabolisme carboné par NO dans les feuilles d'*Arabidopsis* exposées à l'ozone.

6.1. Introduction

L'ozone affecte d'une manière différentielle certaines voies du métabolisme carboné, particulièrement celles des enzymes fixatrices du CO₂. A l'inverse de la Rubisco, la PEPC voit son activité stimulée deux à cinq fois selon les espèces étudiées (Dizengremel, 2001). Une étude sur le Pin d'Alep (Fontaine *et al.*, 2003), a pu relier l'augmentation de cette activité à une augmentation de la quantité de cette enzyme ainsi qu'à celle des transcrits. Dans notre travail nous avons montré également que l'activité PEPC chez le Peuplier ou chez *Arabidopsis* était stimulée en réponse à l'ozone. Dans ces modifications d'activité, obtenues consécutivement à une exposition chronique ou aigue, la part que peuvent prendre les régulations post-traductionnelles (phosphorylation, nitrosylation ...) dans les changements d'activité n'est pas encore connue.

Le monoxyde d'azote est connu pour son implication dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire par la régulation d'expression de gène ou par la modulation de protéines cibles respectives, et ceci particulièrement chez les plantes en conditions de stress biotiques et abiotiques (Baudouin 2010). En réponse à l'ozone (350 ppb, 6h) plusieurs travaux ont relaté la production transitoire du NO qui module la signalisation et l'expression de gènes chez *Arabidopsis* (Ahlfors *et al.*, 2009). Dans ce contexte, nous présentons dans ce chapitre un ensemble de résultats qui montre des effets de NO dans la modulation du métabolisme carboné sous O₃, en particulier dans la régulation de l'activation de l'activité PEPC.

6.2. Publication

1 **NO control of carbon metabolism in *Arabidopsis* leaf under acute ozone exposure**

2
3 Ata Allah Dghim^{1,2,3}, Marie Noelle Vaultier^{1,2,3}, Marie Paule Hasenfratz-Sauder^{1,2,3}, Didier Le
4 Thiec^{2,3}, Pierre Dizengremel^{1,2,3}, Yves Jolivet^{1,2,3}

5
6
7 ¹Université de Lorraine, UMR1137 EEF, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France

8 ²INRA, UMR1137 EEF, F-54280 Champenoux, France

9 ³IFR110 EFABA, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, Cedex, France

10

11

12

13

14

15 Corresponding author: Ata Allah Dghim

16

17

18 Running title: S-nitrosylation of PEPC and cytosolic NADP-dehydrogenase in response to ozone

19

20

21

22

23

24 **Key words:** Ozone, nitric oxide, S-nitrosylation, carboxylases, NADP-dehydrogenases

25 **SUMMARY**

26 Ozone is a phytotoxic pollutant considered to be a raising threat to the planet ecosystems. Recently,
27 an early transitory production of Nitric oxide (NO) during O₃ stress has been documented in
28 *Arabidopsis* and tobacco, attesting of NO implication in the initial events dealing with the oxidative
29 stress generated by O₃. Here we examined the role of nitric oxide (NO) in the modulation of the PEPC
30 and NADP-dehydrogenases, i.e NADP-ME, cGAPDH, cG6PDH, cICDH , activities under O₃ stress.
31 Two genotypes were used, the wild-type, Col-0 and the O₃ sensitive and NO-overproducer mutant,
32 *rcd1*. Experiments using high doses of O₃ (350 ppb, 6h), SNP alone or in combination with O₃ on
33 Col-0, showed that both molecules are capable of inducing leaf lesions, which were aggravated when
34 combined. In addition, both induced *in vivo* stimulation of PEPC, NADP-ME and the inhibition of
35 Rubisco enzymatic activities. Ozone stimulation of the other NADP-dehydrogenases activity was
36 totally prevented SNP-pre-treated Col-0. The combination of cPTIO+L-NNA and O₃ on *rcd1* had an
37 opposing effect to SNP and O₃ on Col-0. *In vitro* incubation of GSNO with Col-0 protein extract
38 strongly enhanced and inhibited the PEPC and the cG6PDH activities, respectively. Predictions of S-
39 nitrosylation sites via the GPS-NO 1.0 showed that most of predominant-cytosolic isoforms of PEPC
40 and NADP-dehydrogenases in *Arabidopsis*, had at least one predicted and highly preserved site.
41 Different location of predicted S-nitrosylation sites in different isoform could help to differentiate
42 them. These results corroborate with the NO control of all these activities in the early response of
43 plant to O₃.

44 **INTRODUCTION**

45

46 In the troposphere, ozone (O₃) is the most prevalent photochemical pollutant with great damaging
47 effects on vegetation and ecosystems [1, 2]. Since the beginning of the industrial era, background
48 levels of this phototoxic air pollutant have doubled leading scientist to predict their progression to
49 very harmful futuristic doses [3, 4]. Current levels of 35 ppb are already detrimental to crop yields
50 [5], responsible for production losses worth US\$11–18 billion [6]. The O₃ negative effects on
51 production and growth are related for the most part to the reduction of photosynthesis [7]. Under O₃
52 stress, part of the limited photosynthesis may be explained by a decrease in stomatal conductance,
53 thus lowering leaf CO₂ influx. In addition, at a biochemical level, negative O₃ effect on
54 photosynthesis could be intensified by a decrease in both amount and activity of Rubisco [8]. On
55 the other hand, other cellular enzymatic activities such as PEPc as well as several cytosolic NADP-
56 dehydrogenases (NADP-ME, cICDH, G6PDH) could be stimulated [9-11]. To induce such cellular
57 responses, O₃ needs to enter the leaf through the stomata and rapidly incites apoplastic ROS
58 formation, which includes superoxide anion (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical
59 (OH[•]) [12]. This quick oxidative burst has much in common with the one observed in
60 hypersensitive-response (HR) during incompatible pathogen-plant interactions [13]. These shared
61 commonalities include changes in gene expression, biosynthesis and accumulation of stress related
62 phytohormones such as ethylene (ET), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) [12]. The
63 aforementioned make O₃ a useful tool to study the mechanistic of plant initial responses to
64 oxidative stresses [14]. One of the most interesting O₃-produced radicals during this event of stress
65 is nitric oxide (NO) [15, 16]. As a signaling molecule, NO is involved in numerous physiological
66 and biological processes in plant. These include transportation of fluid, iron homeostasis, flowering
67 and lignin biosynthesis, disease resistance and responses to abiotic stress [17-19]. The NO effect
68 mainly occurs via the modulation of SA, JA and ET biosynthesis. In addition to hormones, reactive
69 nitrogen species (RNS) and other ROS modulation [15, 20], NO acts together with H₂O₂ to induce
70 PCD [21]. Under O₃, promotion of cell death in the O₃-hypersensitive mutant *radical-induced cell*
71 *death1 (rcd1)*, was suggested to be a result of NO overproduction, combined with the accumulation
72 of both ET and SA [20, 22, 23].

73

74 The lipophilic nature of NO enables its diffusion across plant membranes and endows changes of
75 gene expression [18, 21, 24]. The ability of binding proteins could also create structure variation,
76 thus changing the functional and kinetic proprieties of a given enzyme [19]. This NO post-
77 translational modification or S-nitrosylation in plants, is important as phosphorylation in reversible

78 modulation of protein activity [25]. The S-nitrosylation refers to the covalent binding of NO group
79 to a reactive Cysteine(s) (Cys) residue(s) of the target proteins, which leads to the formation of S-
80 nitrosothiols [26]. In addition to NO (NO^\bullet , NO^+ , NO^-), other active NO moiety can be found in
81 various sources, including metal-NO complexes, peroxynitrite (ONOO^-), nitrite (NO_2^-), SNOs
82 group, or multiple NO_x species [27]. Recently, a strong interest has been raised in the identification
83 of NO-regulated proteins and numerous studies had given evidence of post-translational
84 modification for over 200 different proteins, which are involved in a large variety of cellular
85 functions and signaling events [28]. Interestingly, several enzymes related to both generation and
86 detoxification of oxidative stress interact with NO. Using site-directed mutagenesis of Cys890, it
87 was shown that the NADPH-oxidase was activated by S-nitrosylation during H_2O_2 -induced cell
88 death [29]. In animal cells, NO stimulates the activity of H_2O_2 -producing pathway during the
89 peroxisomal β -oxidation [30]. In plants, enzymes involved in the detoxification of H_2O_2 under O_3 ,
90 such as catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) are, reversibly, inhibited *in vitro* by NO
91 [31, 32]. The MDHAR, which is implicated in the Halliwell-Asada cycle, was also shown to be S-
92 nitrosylated during *Arabidopsis* HR [31]. These results argue in favour of NO control of H_2O_2
93 signaling during O_3 exposure. Several other enzymes, especially those of carbon metabolism, were
94 shown to be NO targets. For example, in crude or purified protein extract, Rubisco activity
95 decreased after S-nitrosylation [33]. Other enzymes such as PEPC and cytosolic NADP-
96 dehydrogenases NADP-ME, cGAPDH and cICDH are also subject to S-nitrosylation [33-36].
97 However, among these enzymes, only cGAPDH and cICDH were shown to be immediately
98 inactivated *in vitro* by the NO modulator GSNO [34, 36]. Recently, three S-nitrosylated Cys in
99 cICDH protein sequence were determined using BS-ICAT [37]. The S-nitrosylation effect on
100 PEPC and NADP-ME activities is still unknown. In regards to the cytosolic glucose-6-phosphate
101 dehydrogenase (cG6PDH), putative S-nitrosylation has yet to also be investigated.

102 The aim of this study is to examine NO regulation of certain carbon metabolism enzymes during
103 ozone exposure. Accordingly, the effect of acute O_3 (350 ppb) exposure was investigated on
104 carboxylases (Rubisco and PEPC) and cytosolic NADPH-dehydrogenases activities (NADP-ME,
105 cG6PDH, ICDH, GAPDH) in the *Arabidopsis* ecotypes, Col-0 and *rcd1* (NO-overproducer). The
106 effect this acute treatment on both genotypes was then compared to the effects of (i) the treatment
107 of Col-0 with the NO donor SNP (Sodium nitroprusside) as an NO exogenous contribution, (ii) the
108 simultaneous treatment of *rcd1* with the NO scavenger cPTIO (2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-
109 tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) combined with the NO synthase inhibitor L-NNA (NG-
110 nitro-L-Arginine) in order to limit both NO production and signalling, (iii) the combination of O_3
111 treatment with the genotype-specific chemical cited above.

112 The impact of a putative S-nitrosylation on activities of PEPC, cG6PDH and NADP-ME was
113 assessed *in vitro*, using Col-0 foliar protein extracts, following their incubation with the NO
114 modulator GSNO. Conservation of predicted S-nitrosylation sites by GPS-SNO 0.1 [38] in plants
115 was addressed using multiple alignments of protein sequence.

116 MATERIAL and METHODS

117

118 Plant material, growth and sampling

119

120 Seeds of *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*, Col-0) and homozygous mutants *rcd1* (Overmyer *et al.*
121 2000) were incubated for 4 d at 4°C and then sown in 7-cm pots containing a support medium of 1:1
122 mixture of perlite and vermiculite. Plants were placed in a controlled-environment growth chamber
123 under a photoperiod of 12 h at an irradiance of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at leaf level), 20°C/18°C
124 (day/night), and 65% humidity. Three plants were transplanted in same sized-pots containing
125 optimum growth soil mixture (N/P/K 14/16/18, 1.2 kg m⁻³, Gramoflor SP1 Universel) fertilised by
126 adding 6-7 mg of slow-release nutrient granules (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertel,
127 Boulogne-Billancourt, France). Before reaching maturity, plants were selected and separated
128 randomly into four experimental phytotronic chambers (2 control, 2 O₃ treatment) with same
129 growth conditions.

130

131 Treatment of plants with ozone alone or in combination with chemical

132

133 Ozone exposure was started at 10:00 h, one hour after the start of the photoperiod, with 350 ppb for
134 6 h. The O₃ exposure alone or combined with SNP treatment was conducted only on Col-0 as an
135 exogenous NO modulator. 0,5 mM of SNP was dissolved in water for 1h and sprayed on plants few
136 moments prior the beginning of O₃ treatment. Identically to SNP treatment, plants were painted
137 with 0.5 mM 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO, Sigma-
138 Aldrich) dissolved in water, then with a solution containing 500 μM of the NO synthase (NOS)
139 inhibitor NG-nitro-L-Arginine (L-NNA, caymanchem). This treatment was used on *rcd1* to prevent
140 NO production and signalling.

141

142 Sampling

143

144 Three different samplings were performed, one directly after O₃ fumigation, and two during the
145 recovery period at 24 h and 48 h after the fumigation. Mature leaves (ML) of three to four different
146 individuals were sampled in each chamber (control or fumigated), then rapidly frozen in liquid
147 nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

148

150 **Standard and *in vitro* S-nitrosylated enzymes Assays**

151
152 Protein extraction was performed according to Dghim *et al.*[9]. Total soluble proteins were
153 determined according to Wildhagen *et al.* (2010)[39]. Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich,
154 Munich, Germany) was used as a calibration standard. Enzymatic activities were assayed using a
155 microplate spectrophotometer (Biotek, PowerWave™ HT, USA). Two duplicates (10 µl) of every
156 leaf extract, from control or O₃-treated plants, were used to measure activities at 30°C. Rubisco (EC
157 4.1.1.39) and PEPC (EC 4.1.1.31) activities were determined by monitoring NADH extinction at
158 340 nm according to the protocol described by Fontaine, Pelloux, Podor, Afif, Gérant, Grieu and
159 Dizengremel [40] and Fukayama, Hatch, Tamai, Tsuchida, Sudoh, Furbank and Miyao [41]
160 respectively. For PEPC the assay medium contained Tris–HCl pH 8.0 (100 mM), NaHCO₃ 5 mM,
161 NADH 0.3 mM, MgCl₂ 20 mM, glucose 6-phosphate 2 mM, malate dehydrogenase (MDH, EC
162 1.1.1.37, Sigma) 15 units mL⁻¹. The reaction was initiated by adding PEP 4 mM. A control without
163 PEP was prepared for each assay. All the protocols used to measure cytosolic NADP-dependent
164 enzymatic activities were based on NADPH formation at 340 nm. The cG6PDH (EC 1.1.1.49)
165 activity was determined following Pitel and Cheliak [42], optimised for the cytosolic isoform
166 activity. NADP-ME activity (EC 1.1.1.40) was determined according to Casati, Spampinato and
167 Andreo [43]. The cICDH (EC 1.1.1.42) activity was measured according to Gupta and Singh [44].
168 The cGAPDH (EC 1.2.1.13) activity was assayed following Gómez Casati, Sesma and Iglesias [45]
169 To determine the *invitro* effect of NO on enzyme activity of PEPC, cG6PDH and NADP-ME,
170 quadruplicates of a control extract were incubated 10 min with different concentrations of GSNO.
171 Reaction was initiated by adding appropriate substrate for each enzyme. Triplicates of the same
172 extracts were incubated with 250 µM of GSH as control. Since determination of PEPC activity
173 requires MDH (EC 1.1.1.37), which has also been predicted to be S-nitrosylated [46], *Invitro* effect
174 of GSNO on activity MDH in crude extract was also determined by monitoring NADH extinction.
175 The reaction used PEPC conditions; Tris–HCl, pH 8.0 (100 mM) containing only NADH 0.3 mM,
176 MgCl₂ 20 mM, malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37, Sigma) 15 units mL⁻¹. The reaction was
177 initiated by adding amino oxyacetate (OAA) 1mM.

178

179 Using bioinformatics to find S-nitrosylation sites

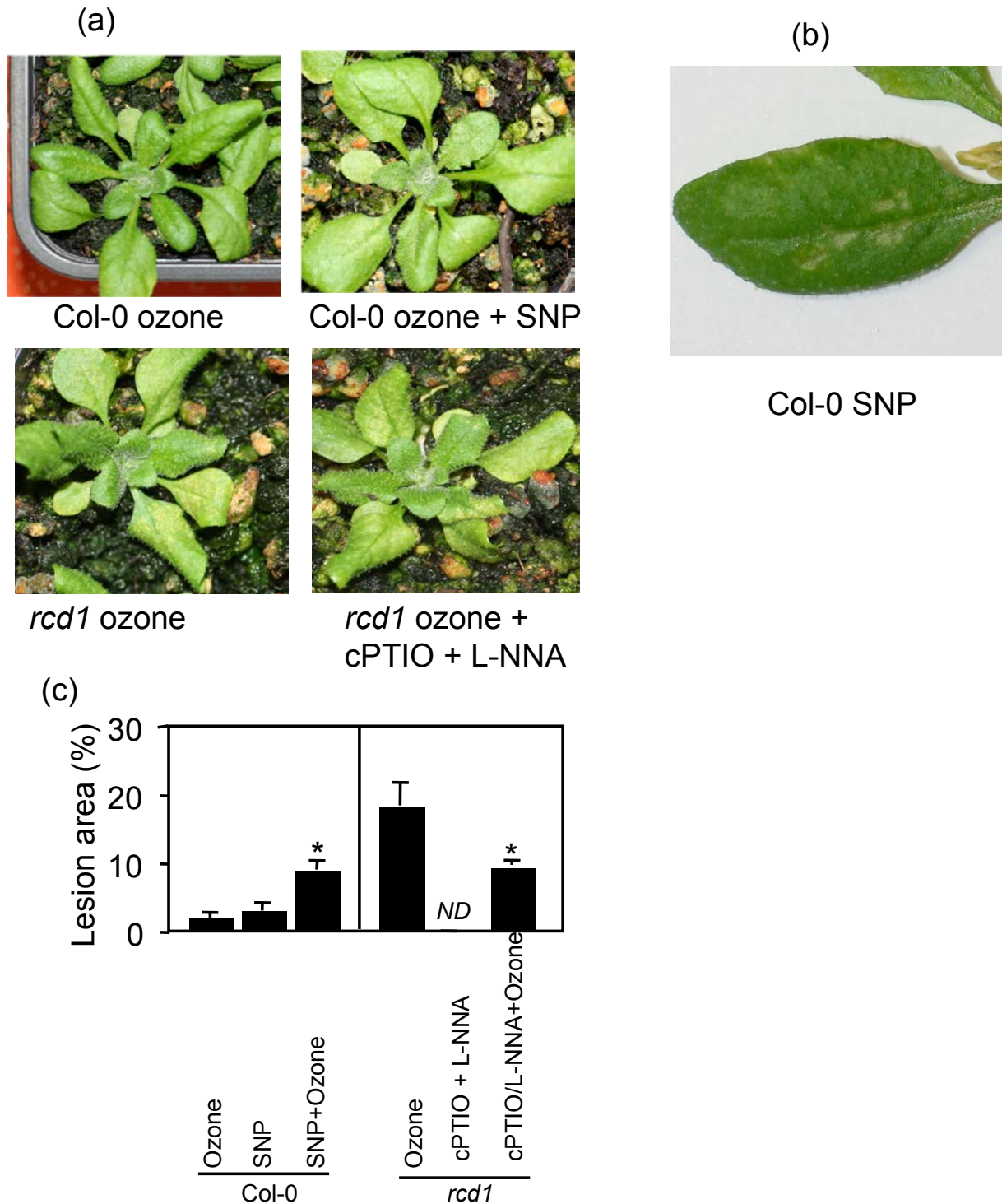
180
181 To predict S-nitrosylation sites we used GPS-SNO 1.0 software, which is available online
182 (<http://sno.biocuckoo.org/online.php>). The program was set on medium threshold. We used protein
183 sequences from TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource, <http://www.Arabidopsis.org>), and
184 NCBI databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Domain annotations, and sensitive sites were
185 provided from the UniProt database (<http://www.uniprot.org/>) [47] and integrated to the protein
186 domain using DOG 1.0 [48]. Protein alignment were built using Geneious basic 4.5.5 Tree Builder
187 (<http://www.geneious.com>).

188

189 Statistical analysis

190

191 The data are presented as means \pm SD. using R [49] data were rearranged into a linear model and
192 submitted to an ANOVA test. Differences between control and different treatments (O₃, chemicals,
193 O₃ combined with chemicals, GSNO) were considered significant if $P < 0.05$. To compare the inter-
194 group means, the ANOVA was followed by *t*-test, in which significantly different means at $P < 0.05$
195 took different letters.



196 Figure 1. Phenotype of Col-0 and *rcd1* at the end of the recovery period (48h) after the end of ozone
 197 treatment (350 ppb, 6h) alone or combined with different ecotypes-specific chemicals. (a) Ozone
 198 induced lesions on Col-0 alone (top left) or combined with 1mM SNP (top right) and ozone induced
 199 lesions *rcd1* alone (bottom left) or combined with 0,5 cPTIO + 500 μ M L-NNA (bottom right). (b)
 200 SNP-induced HR-like lesions on Col-0. (c) Estimation of the lesion area on Col-0 and *rcd1* 48h
 201 after different treatments. ND, non-detected. *Asterisks show significant differences at *P* value <
 202 0.05 relative to ozone treatment alone.

203 **RESULTS**

204

205 **NO and O₃ induces lesions on *Arabidopsis* leaves**

206

207 Nowadays, it is well established that O₃ induces visible foliar damage on vegetation. In this study,
 208 O₃ acute exposure of 350 ppb for 6h induced lesions mainly on ML of the wild type Col-0. Small
 209 bleached areas developed 24h after the O₃ exposure and were more pronounced at day 2 of the
 210 recovery period (48h RP) (Fig. 1a). The spraying of *Arabidopsis* Col-0 with 1mM SNP (NO donor)
 211 led also to the appearance of visible injuries (Fig. 1b) that developed faster and looked quite
 212 different from those produced by O₃. When closely examined, 48h post SNP treated leaves showed
 213 localized collapsed tissue. Combined treatment of O₃ and SNP on Col-0 led to the amplification of
 214 the effects of the treatments tested separately and the manifestation of faster and significantly
 215 higher brownish-yellow lesion areas (Fig. 1c). As expected, expanse of lesions on the O₃-sensitive
 216 genotype *rcd1* were larger then those seen on Col-0 (Fig. 1b). The combination of O₃ with both NO
 217 scavenger cPTIO and NOS inhibitor L-NNA did not completely prevent O₃-induced lesions, but
 218 reduced effectively the damaged area (Fig. 1c).

219

220 **Investigation of *in vivo* NO effect on carboxylases and NADP-dehydrogenase activities during**
 221 **O₃ treatment.**

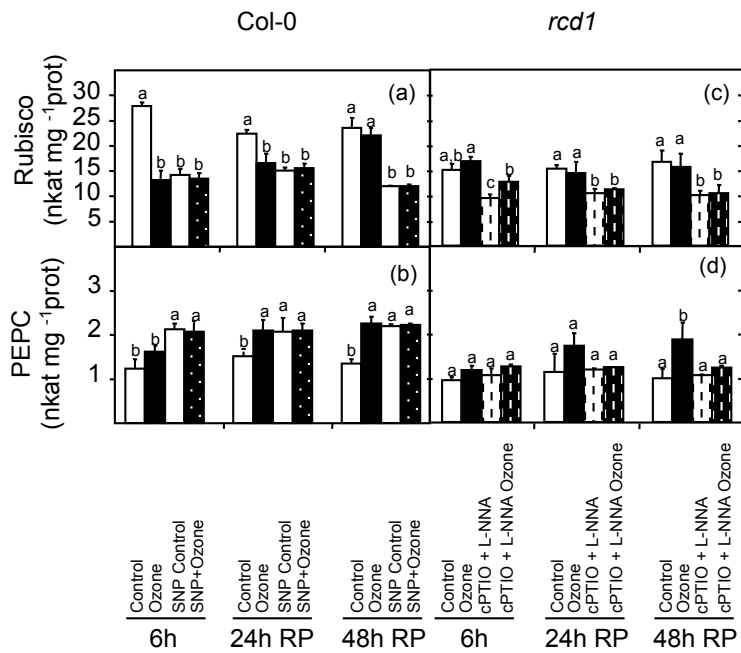
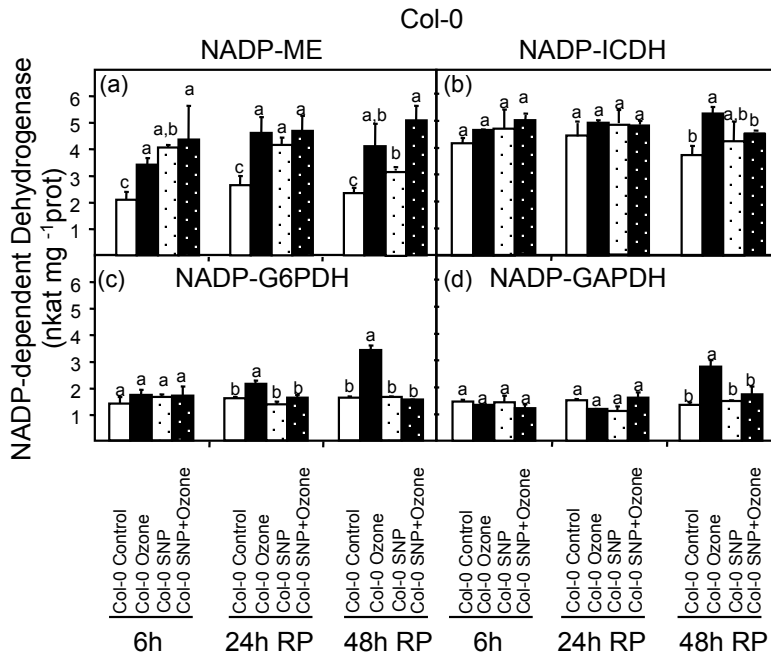
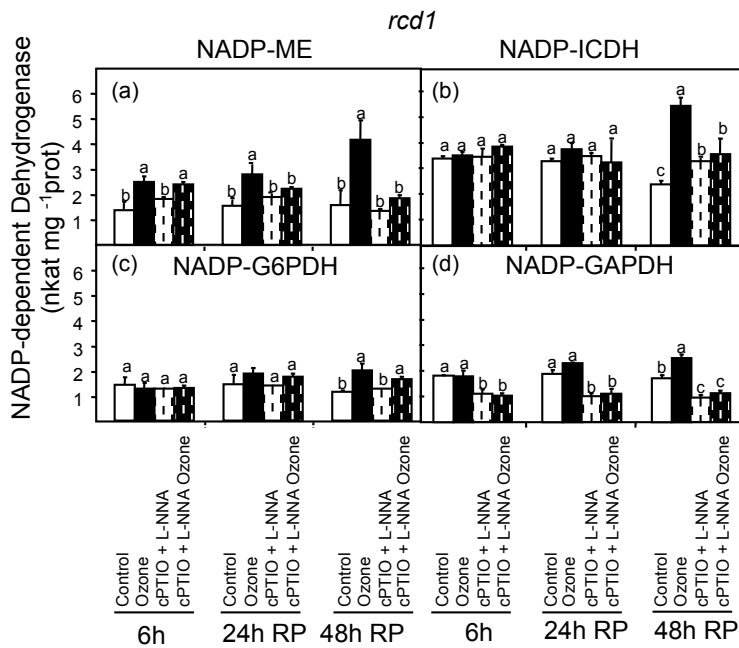


Figure 2. Impact of ozone alone, ecotype specific chemical alone, or both of these combined on Rubisco (a, c) and PEPC (b, d) enzymatic activities in Col-0 (left) and *rcd1* (right) 6h, 24h and 48 after the ends of the treatments. A Tukey rang test was conducted on different treatments group in each sampling date. Means indicated with same letter do not differ significantly (P > 0.05).

The carboxylase activities (Rubisco and PEPC) were measured in Col-0 and *rcd1* plants exposed to 350 ppb O₃ for 6h combined with or without the



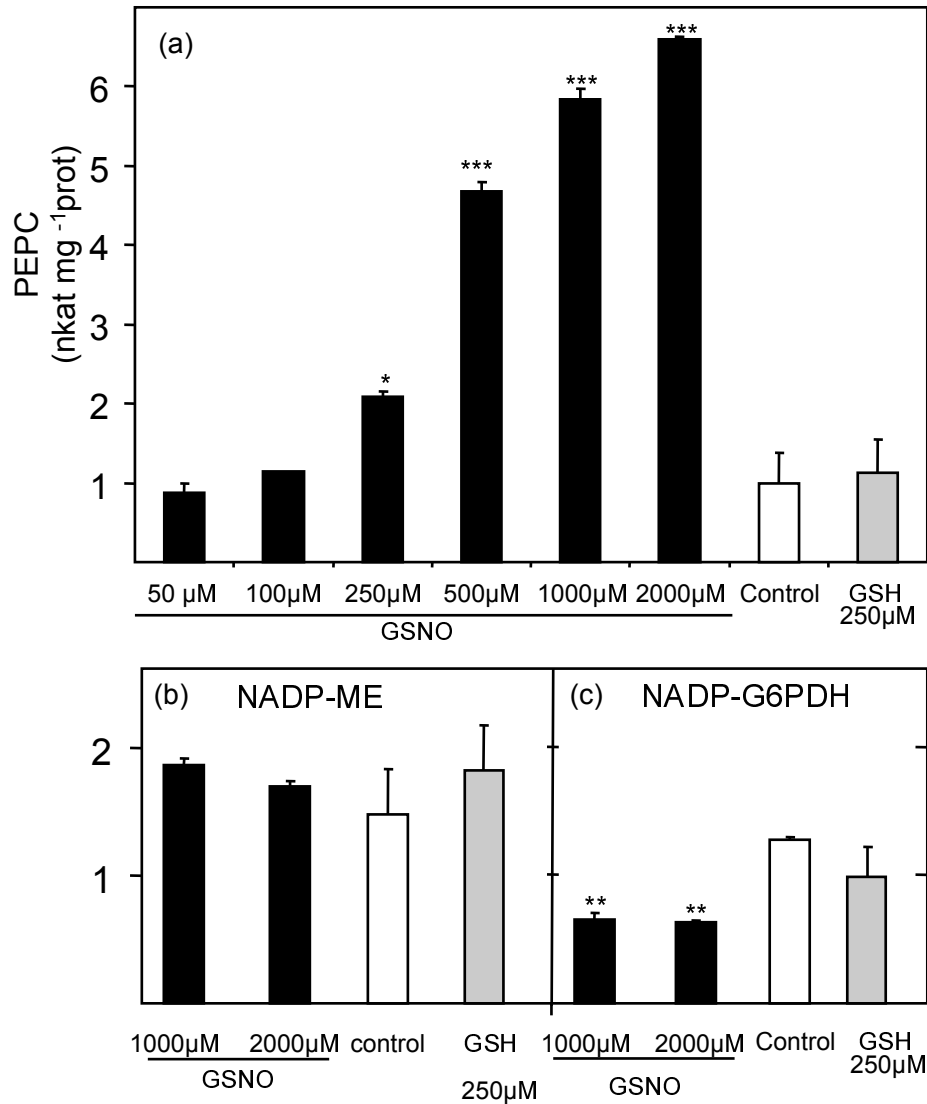
238 Figure 3. Impact of ozone and SNP alone or combined with ozone treatments on Col-0 NADP-EM
 239 (a), cICDH (b), cG6PDH (c), GADPH (d) enzymatic activities. A Tukey rang test was conducted on
 240 different treatments group in each sampling date. Means indicated with same letter do not differ
 241 significantly ($P > 0.05$).



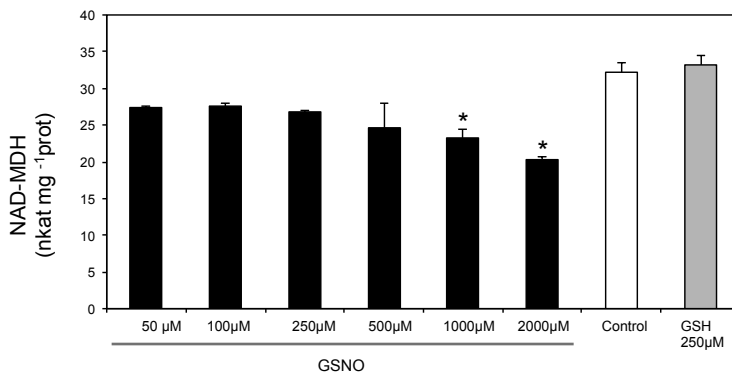
242 Figure 4. Impact of ozone and cPTIO+L-NNAE alone or combined with ozone treatments on *rcd1*
 243 NADP-EM (a), cICDH (b), cG6PDH (c), NADP-GADP (d) enzymatic activities. A Tukey rang test
 244 was conducted on different treatments group in each sampling date. Means indicated with same
 245 letter do not differ significantly ($P > 0.05$).

246 specific chemical reagents (SNP or cPTIO +L-NNA). Measurements were accomplished at the end
247 of the O₃ fumigation period combined or not with different chemical reagents and extended to a
248 recovery period of 24h and 48h after. Regarding Rubisco activity, a rapid and pronounced
249 inhibition occurred in leaf extract of Col-0 6h after O₃ treatment. The same effects occurred in
250 response to SNP treatment alone or combined with O₃ treatment (Fig. 2a). The activity regained
251 control levels in O₃-exposed plants 48h after the end of the treatment while the inhibition was
252 maintained in leaf extract of Col-0 treated with SNP alone or combined with O₃. Conversely, a
253 stimulation of PEPC activity took place 6h after the beginning of the treatments. However, this
254 stimulation was only significant for SNP alone and combined with O₃ (Fig 2b). As for O₃ treatment,
255 the stimulation of PEPC activity reached a maximum at 48h of the recovery period. It is worth
256 mentioning that in *rcdl* control plants, the constitutive level of Rubisco activity was clearly lower
257 than observed for Col-0. For this mutant, the O₃ treatment alone had no effect on Rubisco activity.
258 But, throughout the experiment the application of cPTIO + LNNA (alone or combined with O₃)
259 significantly inhibited the Rubisco activity (Fig 2c). Same *rcdl* protein extracts showed similar
260 constitutive PEPC activity levels to Col-0, where only the O₃ treatment led to a significant
261 stimulation at the end of the recovery period (Fig. 2d).

262
263 All assayed cytosolic NADP-dehydrogenases in Col-0 showed a stimulation of their activities in
264 response to O₃ (Fig. 3). The difference was significant at the end of the recovery period for
265 cG6PDH, cICDH and GAPDH. For NADP-ME, higher activity values were already significant at
266 the end of the fumigation period (6h) (Fig 3a). This early effect also occurred after the SNP
267 application (SNP alone or combined with O₃). The SNP treatment applied alone did not have
268 significant effect on the other NADP-dehydrogenases (except for ICDH at the end of the recovery
269 period). However, when combined with O₃, SNP partially (ICDH) or completely (G6PDH and
270 GAPDH) prevented the activity stimulation (Fig. 3b, c, d). As observed in Col-0, significant
271 stimulation of NADP-dehydrogenases also occurred at the end of the experiment in O₃-treated *rcdl*
272 (Fig. 4). The early stimulation of ME activity in response to O₃ was also detected (Fig 4a). As
273 observed for PEPC (Fig. 2d), the cPTIO + L-NNA treatment removed the stimulation of NADP-ME
274 (Fig 4a) in O₃-treated *rcdl*. No major effects were noticed for the other NADP-dehydrogenases
275 except for GAPDH activity, which was inhibited in response to chemical treatments (cPTIO + L-
276 NNA) (Fig 4 b, c, d).



277 Figure 5. Impact of GSNO incubation on PEPC (a), NADP-ME, and cG6PDH enzymatic activities
 278 in leaf extracts of *Arabidopsis thaliana* (Col-0). Enzymes were assayed after 10 minutes incubation
 279 with different GSNO concentration or with GSH (250 μM). Significant differences between GSNO-
 280 treated and control leaf extract are indicated by * ($p < 0.05$) and by ** ($p < 0.01$) and by ***
 281 ($p < 0.001$).



282 **Supplemental Figure 1.** Inhibition of NAD-MDH by different concentration of GS-NO. Significant
 283 differences between GSNO-treated and control leaf extract are indicated by * ($p < 0.05$).

284 *In vitro* NO effects on PEPC, NADP-ME and cG6PDH activities

285
286 The *in vitro* sensitivity of PEPC and both cytosolic NADP-ME and cG6PDH to a NO enriched
287 *medium* was tested by incubating Col-0 crude protein extracts with different GSNO concentrations.
288 The PEPC activity was stimulated as the concentration of GSNO increased (Fig 5a). The
289 stimulation effect was significant for 250 μ M and above (Fig. 5a). The incubation with GSH, which
290 was used as control, had no effect on the PEPC enzymatic activity. Furthermore, This positive
291 effect of GSNO on PEPC activity is not be associated to any effect on the NAD-MDH, which is
292 used for PEPC activity determination. In fact, MDH activity decreased significantly when incubated
293 with high GSNO concentration (1000 and 2000 μ M) (Supplemental Fig. 1). Both NADP-ME and
294 cG6PDH were tested with high concentration of GSNO (1000 μ M and 2000 μ M). These
295 concentrations led to a significant inhibition of the G6PDH activity (Fig. 5c), while no effect was
296 noticed on NADP-ME activity

297
298 Predicting S-nitrosylation sites in studied enzymes and indications of their conservation in
299 plants.

300
301 Since conventional experimental S-nitrosylation sites determined *via* site-directed mutagenesis is a
302 laborious and demanding task, highly sensitive and accurate software such as the GPS-SNO 0.1
303 could be a very good alternative and a short cut to determine multiple S-nitrosylated Cys before
304 getting to the experimental procedures [38]. The table 1 presents the position, the hit score, the
305 cluster, and the aminoacids (aa) sequence including the predicted S-nitrosylated Cys found in
306 different *Arabidopsis thaliana* PEPC and cytosolic NADP-dehydrogenases isoforms. In addition,
307 we included their active site positions (co-factors and substrate-binding sites) found in Uniprot
308 database. The *Arabidopsis* genome contains four genes, coding four different PEPC isoforms (Table
309 1). Two genes are mainly expressed in *Arabidopsis* leaves, PEPC2 and PEPC1, with a
310 predominance of PEPC2 transcripts. Their protein sequences enclosed two common positive Cys
311 having very high cluster C scores (Table 1). A third cluster B Cys, exclusively scored for PEPC2,
312 was very close to that of the active sites (His172) (Table 1). These three Cys were conserved in C3,
313 C4 and CAM plants (Fig. 6). The high scoring hit Cys residue found in bacterial type isoform
314 PEPC4 was classified as cluster B (Table 1). Although this Cys site was conserved in plants it
315 didn't come out positive in some of randomly processed BTPEPc (Bacterial type PEPC) sequences.

316 Table 1. Position, sequence containing, score and cluster classification of the predicted S-nitrosylated
 317 cysteine in protein sequences of *Arabidopsis*. All presented characteristics are outcomes of the GPS-SNO
 318 software. Predominate isoforms are highlighted in grey when several isoforms are described as present in
 319 the cytosol.
 320

| | Active/Sensitive sites/ regions | Cysteine position | Sequence | Score | Cluster |
|----------------------|--|----------------------|--|---------------------------|-------------|
| PEPC1 | Active sites: 173, 602 | 304 549 | PEVTRDVCLLARMMA VELLQRECRVKQPLR | 22,146 21,328 | C C |
| PEPC2 | Active sites: 172, 599 | 191 303 546 | KFGRIIRDCLTQLYAK PEVTRDVCLLARMMA VELLQRECGITDPLR | 2,478 22,146 21,971 | B C C |
| PEPC3 | Active sites: 173, 603 | 304 550 | PEVTRDVCLLARMMA VELLQRECHVKNPLR | 22,146 21,328 | C C |
| PEPC4 | Active sites: 169, 699 | 497 | LLEPLLLCYESLQSS | 4,054 | B |
| NADP- ME1 | Active sites: 129, 200 | 215 567 | GGVRPSACLPTIDV RPKDIVKCAESSMYS | 2,554 3,44 | B B |
| NADP- ME2 | Active sites: 136, 207 | 264 | EFLHEFMCAVKQNYG | 21,387 | C |
| NADP- ME3 | Active sites: 136, 207 | 264 | EFLQEFMCAVKQNYG | 22,27 | C |
| cG6PDH6 | Proton acceptor: 274 NADP binding: 40, 73 Substrat binding: 212, 216 Phosphoserine: 18 | 31 280 | GIVPETGCLSIIVLG NHLLQVLCLVAMEKP | 2,63 21,526 | B C |
| cG6PDH5 | Proton acceptor: 275 NADP-binding: 40, 73 Substrat binding: 213, 217, 366 Phosphoserine: 18 | 281 | NHLLQVLCLVAMEKP | 21,526 | C |
| cICDH | Critical Regions: 77->79, 96- >102, 310->315, Metal binding sites: 252, 275 Substrat binding sites: 79, 111, 134 NADP binding: 84, 260, 328 | 297 363 | LMTSVLVCPDGKTIE TEKLEAACVGTVESG | 2,576 4,06 | B B |

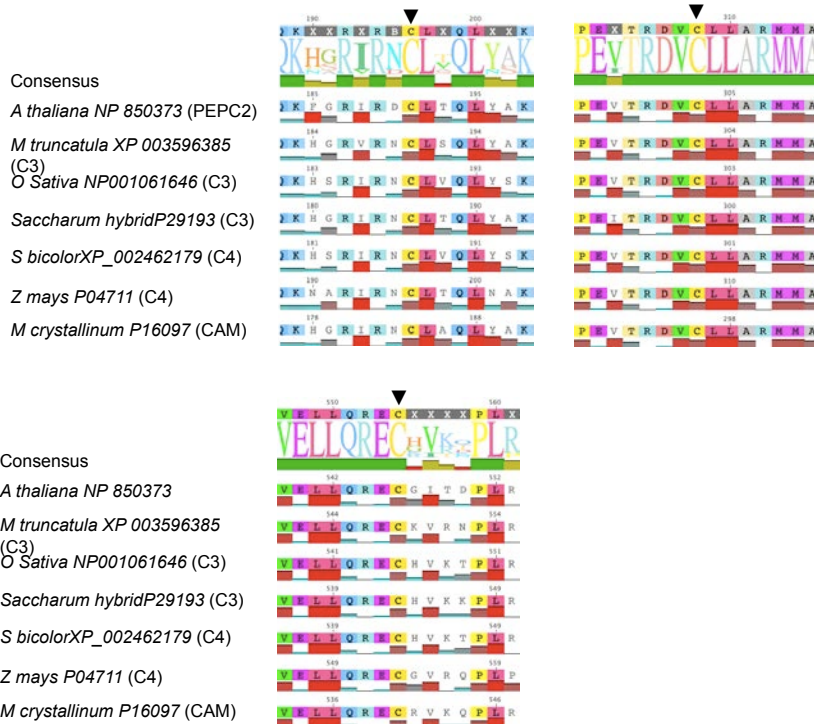
321 *Arabidopsis* Genome possesses three genes coding the cytosolic NADP-dependant NADP-ME,
322 (NADP-ME1, NADP-ME2 and NADP-ME3). The NADP-ME2 isoform predominates in
323 *Arabidopsis* aerial organs, particularly in leaves [50]. For this protein only one predicted S-
324 nitrosylation site (Cys264) was determined, not distant from an active site (Lys207: proton
325 acceptor). However this site was conserved only in *Arabidopsis* isoforms (NADP-ME2, NADP-
326 ME3) (Supplemental Fig. 3a).

327 It is worth mentioning that the NADP-ME1 protein sequence, which prevails in roots [50],
328 contained two different positive Cys one of which (Cys215) is conserved in plants (Supplemental
329 Fig. 3b). This hit Cys is close to the active site mentioned above (Lys200: proton acceptor).
330 Together with a Valine residue, we used this particular positive predicted Cys to differentiate
331 NADP-ME1 from the other isoforms in plants (Supplemental Fig. 3c).

332 Concerning G6PDH, two genes code for cytosolic proteins, G6PDH5 and G6PDH6. Only G6PDH5
333 is responsible for the cytosolic activity in the *Arabidopsis* leaves [51]. A common Cys site
334 classified as cluster C was found within a very conserved domain in the protein sequences of both
335 these proteins (Supplemental Fig. 3). This S-nitrosylation Cys is not far from an active site (His275:
336 proton acceptor). However for G6PDH6, a second cluster B hit site (Cys31) situated close to a
337 NADPH binding and a phosphorylation site was additionally scored (Table 1). This particular site
338 was used to differentiate between these two isoforms in C3 plants when the sequence alignment
339 was performed.

340 Finally, for the unique *Arabidopsis* cytosolic isoform cICDH, two Cys were predicted within the
341 protein sequence, one of which is experimentally confirmed (Cys363, Table 1) [37]. It is important
342 to note that the confirmed S-nitrosylated Cys75 is very close to both NADP and substrate-binding
343 sites. All these Cys, including those predicted by GPS-NO 1.0, are conserved in plants
344 (Supplemental Fig. 4). No hit sites were predicted for the cGAPDH isoform.

PEPC



345 Figure 6. Multiple sequence alignments showing conservation of the GPS-SNO 0.1-predicted S-
 346 nitrosylated cysteines (▼) in *At*PEPC2 sequences with related proteins in C3, C4, and CAM plants.
 347 The alignment was built using Geneious basic 4.5.5 Tree. Hydrophobicity is highlighted under each
 348 sequence. Numbers show position from the first amino acid.

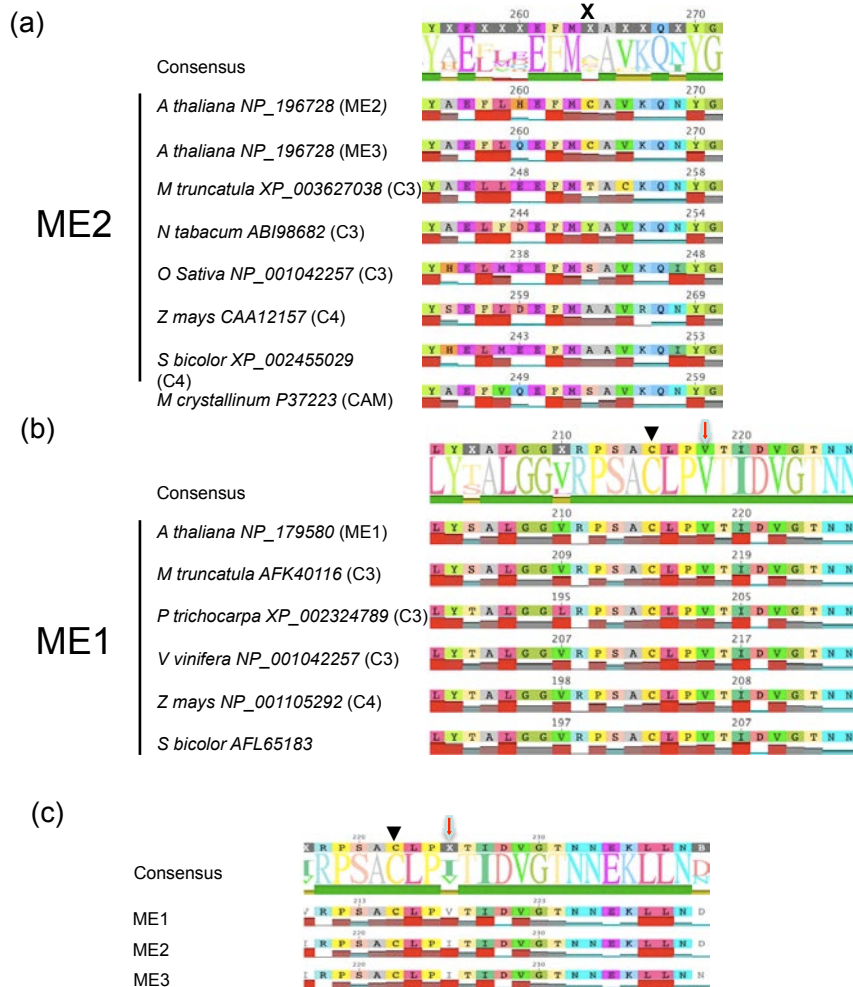
349 **DISCUSSION**

350

351 Recently NO rapid production and accumulation induced by O₃ have been documented for tobacco
352 and *Arabidopsis* [20]. Ahlfors *et al* [15] described two NO peaks after an acute O₃ treatment (350
353 ppb, 8h) for *Arabidopsis*. The first, which started from guard cells and spread to adjacent epidermal
354 and then to mesophyll cells, took place 2-3h after the beginning of the exposure. Later, a second
355 NO production peak was detected overlapping lesion formation. In our study, lesions appeared
356 rapidly and abundantly after O₃ treatment on plants where NO supply was enhanced, thus in Col-0
357 pre-treated with SNP or the NO overproducer mutant, *rcd1*. The treatment with NO scavengers
358 and NO L-arginine production inhibitors of *rcd1* attenuated O₃- induced cell death. Moreover,
359 studies testing *in vivo* effects of NO donors showed that only SNP is capable of inducing
360 programmed cell death and the suppression of ROS-scavenging systems [52, 53]. Concentration of
361 SNP used in our study, induced fast distinctive lesions on *Arabidopsis*, suggesting that the NO
362 redox form released by this particular donor could play a important role in the on/off switch of the
363 appropriate metabolic modifications during cell death [15]. On the other hand, our results
364 corroborate with previous reports on NO modulation of cell death in plant exposed to O₃. All these
365 observations attested to role of NO in the extent of O₃-induced necrosis.

366 In this study, we confirmed the contrasting effects of O₃ exposure on carboxylase activities in
367 *Arabidopsis*, as we observed both fast inhibition of Rubisco and the activation of PEPC 6h after the
368 beginning of the treatment. Interestingly, SNP spraying induced the same contrasting effect on Col-
369 0 carboxylases and yet stronger during the same delay. Taking into account the SNP faculty as the
370 only known pharmacological NO modulator capable of inducing cell death, its liberation of NO could
371 mimic and explain NO-mediated physiological events occurring under O₃. Adopting this approach,
372 the previously recorded production of NO in the first hours of O₃ treatment [15] could explain, in
373 our cases, the modification observed on both Rubisco and PEPC enzymatic activities. Several
374 findings could corroborate this hypothesis. First, besides being rapidly inhibited when incubated
375 with different concentration of GSNO [33], the application of SNP (0,5 mM) for 6h on *Phaseolus*
376 *aureus* (Mung bean) leaves led to a dramatic down-regulation not only of Rubisco but also Rubisco
377 activase [54], the enzymatic activity of which is needed for Rubisco activation. Besides negative
378 repercussions, SNP is known to have the longest half-life among other NO modulators, which can
379 last for 12h. Thus, all of the above could explain why the inhibition of Rubisco observed after SNP
380 treatments lasted longer than O₃ alone as the production of NO in this case is only transitory.

ME



381 **Supplemental Figure 2.** Multiple Sequence alignment of *At*NADP-ME2 (a) or *At*NADP-ME1 (b)
 382 with related proteins in C3, C4, and CAM plants. Conservation of the GPS-SNO 0.1 predicted S-
 383 nitrosylated cysteine in *At*NADP-ME1(▼). (c) Sequence alignment of *At*NADP-ME (NADP-ME1,
 384 NADP-ME2-3). Red arrow appoints the only differing amino-acid preventing the Cysteine222 of
 385 *At*NADP-ME2-3 form being predicted by GPS-SNO 0.1. The alignment was constructed using
 386 Geneious basic 4.5.5. Hydrophobicity is highlighted under each sequence. Numbers show position
 387 from the first amino acid.

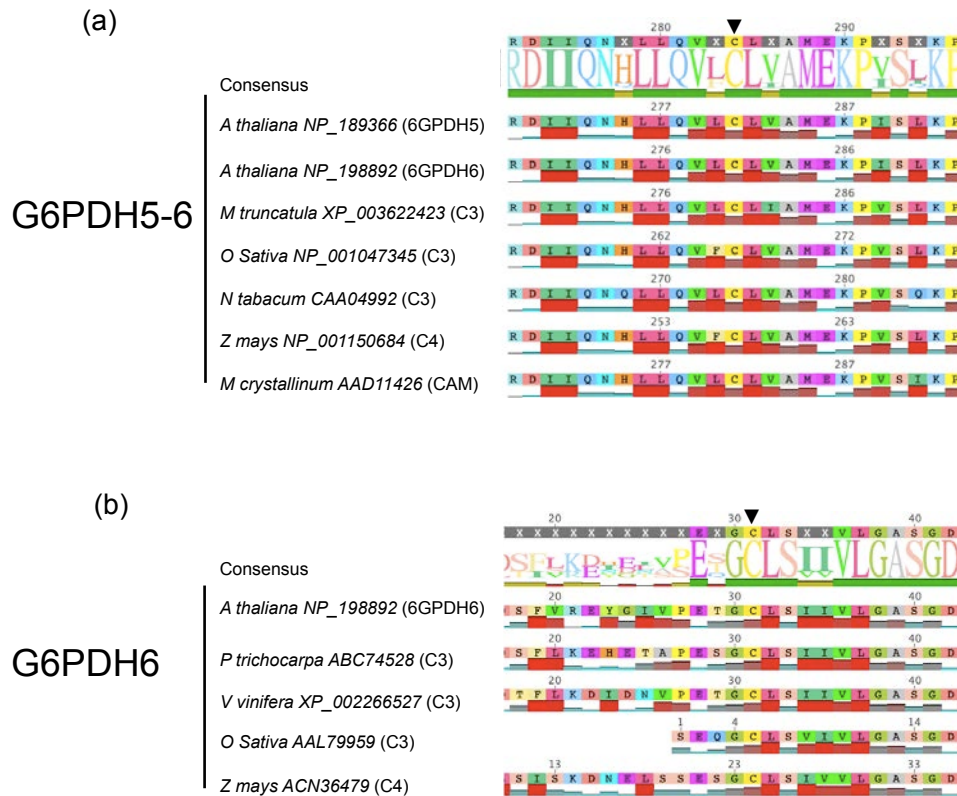
388 Second, in this study we showed for the first time a correlation between increasing *invitro* PEPC
389 activity and the rise of GSNO concentration. In addition, even though reasons for pushing *rcd1* to
390 overproduce NO are still unknown, restraining *invivo* NO signaling and production using cPTIO
391 and L-NNA in this ecotype completely prevented the PEPC stimulation seen in O₃-treated *rcd1*. In
392 this context, we processed *At*PEPC isoforms looking for potential S-nitrosylation sites using GPS-
393 SNO 0.1 software. The presence of three Cys positive sites within PEPC2 and its position as the
394 predominant isoform in *Arabidopsis* make it a relevant candidate for the modulation of its activity
395 by NO. The conservation of these Cys in C3, C4 and CAM, specially the one positioned next to the
396 N-terminal active site, suggests that NO modulation of PEPC activity is well spread and conserved
397 among vascular plants in this event of stress. All the results discussed for carboxylases could
398 indicate, a general need for a rapid control of carbon metabolism via NO signaling taking place in
399 initial hours in plant under O₃ stress.

400 In the cytosol the stimulation of PEPC will provide malate, via MDH activity, which is
401 decarboxylated by NADP-ME. This enzyme activity reacted in a similar manner to PEPC activity in
402 various treatments. Controversially, incubation with the NO modulator GSNO had no effect on its
403 *in vitro* activity. The unique predicted S-nitrosylation within the predominate NADP-ME2 isoforms
404 was not conserved among C3 plants. Taken together, these results could suggest that the NADP-ME
405 stimulation during O₃ exposure is not a direct effect of NO *via* S-nitrosylation but depends rather on
406 NO signaling. However, interpretation of the results above requires an ere of caution for different
407 reasons. First, behavior of different isoforms of NADP-ME in *Arabidopsis* under stress have not yet
408 been described. The NO controle of NADP-ME *via* S-nitrosylation is still a plausible event, taking
409 into account presence of two predicted S-nitrosylated Cys in NADP-ME1, which were found to be
410 highly conserved among plants. In addition, NADP-ME was shown to undergo glutathionylation
411 under abiotic stress [55], thus testing its activity *in vitro* with other NO donors should be
412 considered.

413 In contrasting manner, the rest of NADP-dehydrogenase activities had similar evolution facing O₃
414 or NO stress. In fact, in addition to the GSNO inhibition reported for cGAPDH, cICDH [34, 36]. e
415 showed similar alteration of cG6PDH activity after the incubation with high concentration of the
416 same NO modulator. These observations could explain the lower stimulation of their activities
417 under O₃ observed for *rcd1* compare to Col-0 (Fig. 3 and Fig.4), and rule out for a potential
418 regulation *via* S-nitrosylation.

419 We could hypothesize, that when O₃ and SNP were combined, *invivo* high levels of NO could
420 attenuate the O₃ stimulation effect and would amplify the development of necrosis (Fig.1).

G6PDH



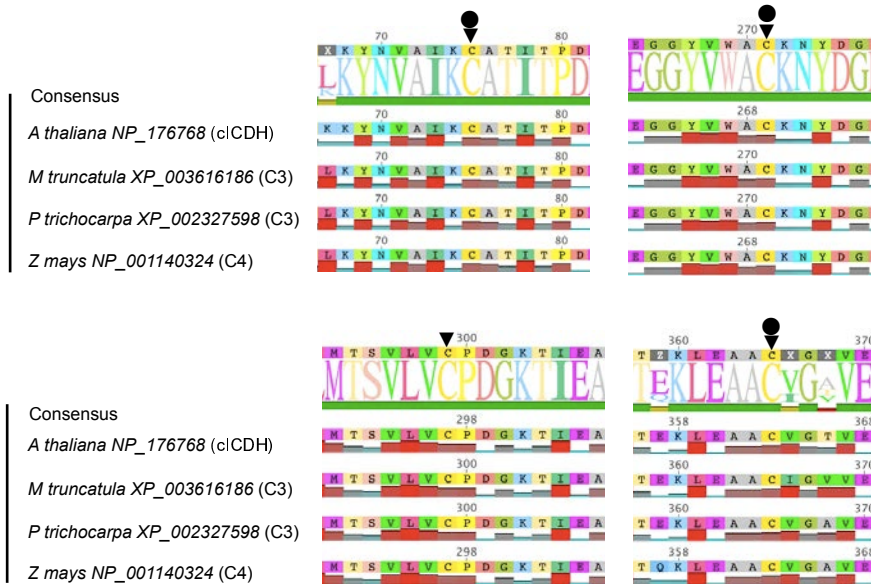
421
 422 **Supplemental Figure 3.** Multiple sequence alignment showing the conservation of predicted S-
 423 nitrosylated cysteine (▼) in *At*G6PDH5-6 or *At*G6PDH6 sequences with related proteins in C3, C4,
 424 and CAM plants. The alignment was constructed using Geneious basic 4.5.5. Hydrophobicity is
 425 highlighted under each sequence. Numbers show position from the first amino acid.

426 Examination of NADP-dehydrogenase for S-nitrosylation sites showed that each one of them had at
427 least one positive GPS-SNO 0.1 site. Besides being classified as cluster B, the first positive site
428 (Cys31) found in *AtG6PDH6* isoform is located next to sensible sites in the protein.

429 The NADP-dependent dehydrogenases mentioned above are the main NADPH producing activities
430 in the cytosol. The NADPH produced is essential for the regeneration of reduced glutathione [56].
431 Hence, playing an important antioxidant role not only in O₃ stress but also in other oxidative
432 stresses. Lower NADPH levels in the cytosol will lead to a higher ROS extent, allowing NO or
433 H₂O₂ signaling and changes in gene expression. This hypothesis has been proposed in response to
434 salt stress with an inhibition of the ICDH [37]. However such hypothesis needs further
435 investigations, particularly to understand contrasting events leading to the stimulation of NADP-
436 ME.

437

cICDH



438 **Supplemental Figure 4.** Multiple sequence alignment showing the conservation of the GPS-NO
 439 0.1-predicted S-nitrosylated cysteine (▼) of *AtcICDH* with related proteins in C3, and C4 plants
 440 and. (●) S-nitrosylated cysteine identified *via* BS-ICAT [37]. The alignment was constructed using
 441 Geneious basic 4.5.5. Hydrophobicity is highlighted under each sequence. Numbers show position
 442 from the first amino acid.

443 REFERENCES

- 444 [1] L. Ainsworth, Impacts of Ozone on NPP, Annual Review of Plant Biology, 63 (2012).
- 445 [2] A.S. Heagle, Ozone and Crop Yield*, Annual Review of Phytopathology, 27 (1989) 397-423.
- 446 [3] M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. Van der Linden, C.E. Hanson, IPCC, 2007:
- 447 climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the
- 448 fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, Cambridge University
- 449 Press, Cambridge, 2007.
- 450 [4] R. Society, D. Fowler, Ground-level ozone in the 21st century: future trends, impacts and policy
- 451 implications, The Royal Society, 2008.
- 452 [5] J. Fuhrer, Ozone risk for crops and pastures in present and future climates, Naturwissenschaften,
- 453 96 (2009) 173-194.
- 454 [6] S. Avnery, D.L. Mauzerall, J. Liu, L.W. Horowitz, Global crop yield reductions due to surface
- 455 ozone exposure: 2. Year 2030 potential crop production losses and economic damage under two
- 456 scenarios of O₃ pollution, Atmospheric Environment, (2011).
- 457 [7] Dizengremel P (2001) Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. Plant
- 458 Physiology and Biochemistry 39 (9):729-742.
- 459 [8] P. Dizengremel, Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees, Plant Physiology and
- 460 Biochemistry, 39 (2001) 729-742.
- 461 [9] A. A. Dghim, J. Dumont, M.P. Hasenfratz-Sauder, M.N. Vaultier, P. Dizengremel, D. Le Thiec,
- 462 Y. Jolivet, Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in
- 463 ozone sensitivity, Physiologia planta (2012).
- 464 [10] P. Dizengremel, M.-N. Vaultier, D. Le Thiec, M. Cabané, M. Bagard, D. Gérant, J. Gérard,
- 465 A.A. Dghim, N. Richet, D. Afif, J.-C. Pireaux, M.-P. Hasenfratz-Sauder, Y. Jolivet,
- 466 Phosphoenolpyruvate is at the crossroads of leaf metabolic responses to ozone stress, New
- 467 Phytologist, 195 (2012) 512-517.
- 468 [11] P. Dizengremel, D. Le Thiec, M.P. Hasenfratz-Sauder, M.N. Vaultier, M. Bagard, Y. Jolivet,
- 469 Metabolic-dependent changes in plant cell redox power after ozone exposure, Plant Biology, 11
- 470 (2009) 35-42.
- 471 [12] A. Castagna, A. Ranieri, Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to
- 472 gene expression adjustment, Environmental Pollution
- 473 Special Issue Section: Ozone and Mediterranean Ecology: Plants, People, Problems, 157 (2009)
- 474 1461-1469.
- 475 [13] J. Kangasjärvi, P. Jaspers, H. Kollist, Signalling and cell death in ozone-exposed plants, Plant,
- 476 Cell & Environment, 28 (2005) 1021-1036.
- 477 [14] M.V. Rao, J.R. Koch, K.R. Davis, Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants,
- 478 Plant Molecular Biology, 44 (2000) 345-358.
- 479 [15] R. Ahlfors, M. Brosché, H. Kollist, J. Kangasjärvi, Nitric oxide modulates ozone-induced cell
- 480 death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*, The Plant Journal, 58
- 481 (2009) 1-12.
- 482 [16] L. Ederli, R. Morettini, A. Borgogni, C. Wasternack, O. Miersch, L. Reale, F. Ferranti, N.
- 483 Tosti, S. Pasqualini, Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative
- 484 oxidase in ozone-treated tobacco plants, Plant physiology, 142 (2006) 595-608.
- 485 [17] X. Huang, U. von Rad, J. Durner, Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric
- 486 oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells, Planta, 215 (2002) 914-923.
- 487 [18] M. Parani, S. Rudrabhatla, R. Myers, H. Weirich, B. Smith, D.W. Leaman, S.L. Goldman,
- 488 Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*, Plant Biotechnology
- 489 Journal, 2 (2004) 359-366.
- 490 [19] M. Delledonne, NO news is good news for plants, Curr Opin Plant Biol, 8 (2005) 390-396.

- 491 [20] R. Ahlfors, M. Brosché, J. Kangasjärvi, Ozone and nitric oxide interaction in *Arabidopsis*
492 *thaliana*: A role for ethylene?, *Plant signaling & behavior*, 4 (2009) 878-878.
- 493 [21] E. Zago, S. Morsa, J.F. Dat, P. Alard, A. Ferrarini, D. Inzé, M. Delledonne, F. Van Breusegem,
494 Nitric oxide-and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in
495 tobacco, *Plant physiology*, 141 (2006) 404-411.
- 496 [22] K. Overmyer, H. Tuominen, R. Kettunen, C. Betz, C. Langebartels, H. Sandermann, J.
497 Kangasjärvi, Ozone-sensitive *Arabidopsis* *rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and
498 jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death, *The Plant Cell Online*,
499 12 (2000) 1849-1862.
- 500 [23] K. Overmyer, M. Brosché, J. Kangasjärvi, Reactive oxygen species and hormonal control of
501 cell death, *Trends in plant science*, 8 (2003) 335-342.
- 502 [24] S. Grün, C. Lindermayr, S. Sell, J. Durner, Nitric oxide and gene regulation in plants, *Journal*
503 *of Experimental Botany*, 57 (2006) 507-516.
- 504 [25] Baudouin E (2011) The language of nitric oxide signalling. *Plant Biology* 13 (2):233-242.
- 505 [26] D.T. Hess, A. Matsumoto, S.O. Kim, H.E. Marshall, J.S. Stamler, Protein S-nitrosylation:
506 purview and parameters, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6 (2005) 150-166.
- 507 [27] J.S. Stamler, S. Lamas, F.C. Fang, others, Nitrosylation-The Prototypic Redox-Based
508 Signaling Mechanism, *Cell*, 106 (2001) 675-684.
- 509 [28] J. Astier, S. Rasul, E. Koen, H. Manzoor, A. Besson-Bard, O. Lamotte, S. Jeandroz, J. Durner,
510 C. Lindermayr, D. Wendehenne, S-nitrosylation: An emerging post-translational protein
511 modification in plants, *Plant Science*, (2011).
- 512 [29] B.W. Yun, A. Feechan, M. Yin, N.B.B. Saidi, T. Le Bihan, M. Yu, J.W. Moore, J.G. Kang, E.
513 Kwon, S.H. Spoel, others, S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant
514 immunity, *Nature*, (2011) 264-268.
- 515 [30] K. Dobashi, K. Pahan, A. Chahal, I. Singh, Modulation of endogenous antioxidant enzymes by
516 nitric oxide in rat C6 glial cells, *Journal of neurochemistry*, 68 (1997) 1896-1903.
- 517 [31] M.C. Romero-Puertas, N. Campostrini, A. Matte, P.G. Righetti, M. Perazzolli, L. Zolla, P.
518 Roepstorff, M. Delledonne, Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana*
519 undergoing hypersensitive response, *Proteomics*, 8 (2008) 1459-1469.
- 520 [32] D. Clark, J. Durner, D.A. Navarre, D.F. Klessig, Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and
521 ascorbate peroxidase, *Molecular plant-microbe interactions*, 13 (2000) 1380-1384.
- 522 [33] J.K. Abat, R. Deswal, Differential modulation of S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low
523 temperature: change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its
524 carboxylase activity, *Proteomics*, 9 (2009) 4368-4380.
- 525 [34] E.S. Yang, C. Richter, J.S. Chun, T.L. Huh, S.S. Kang, J.W. Park, Inactivation of NADP⁺-
526 dependent isocitrate dehydrogenase by nitric oxide, *Free Radical Biology and Medicine*, 33 (2002)
527 927-937.
- 528 [35] C. Lindermayr, G. Saalbach, G. Bahnweg, J. Durner, Differential inhibition of *Arabidopsis*
529 methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation, *Journal of Biological Chemistry*, 281
530 (2006) 4285-4291.
- 531 [36] C. Lindermayr, G. Saalbach, J. Durner, Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in
532 *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 137 (2005) 921-930.
- 533 [37] A. Fares, M. Rossignol, J.B. Peltier, Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in
534 *Arabidopsis*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2011).
- 535 [38] Y. Xue, Z. Liu, X. Gao, C. Jin, L. Wen, X. Yao, J. Ren, GPS-SNO: computational prediction
536 of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm, *PloS one*, 5 (2010) e11290-e11290.
- 537 [39] H. Wildhagen, J. Dürr, B. Ehlting, H. Rennenberg, Seasonal nitrogen cycling in the bark of
538 field-grown Grey poplar is correlated with meteorological factors and gene expression of bark
539 storage proteins, *Tree physiology*, 30 (2010) 1096-1110.

- 540 [40] V. Fontaine, J. Pelloux, M. Podor, D. Afif, D. Gérant, P. Grieu, P. Dizengremel, Carbon
541 fixation in *Pinus halepensis* submitted to ozone. Opposite response of ribulose-1,5-bisphosphate
542 carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase, *Physiologia Plantarum*, 105 (1999)
543 187-192.
- 544 [41] H. Fukayama, M.D. Hatch, T. Tamai, H. Tsuchida, S. Sudoh, R.T. Furbank, M. Miyao,
545 Activity regulation and physiological impacts of maize C 4-specific phospho enol pyruvate
546 carboxylase overproduced in transgenic rice plants, *Photosynthesis Research*, 77 (2003) 227-239.
- 547 [42] J.A. Pitel, W.M. Cheliak, Effectiveness of protective agents for increasing activity of five
548 enzymes from vegetative tissues of white spruce, *Canadian journal of botany*, 64 (1986) 39-44.
- 549 [43] P. Casati, C.P. Spampinato, C.S. Andreo, Characteristics and physiological function of NADP-
550 malic enzyme from wheat, *Plant and cell physiology*, 38 (1997) 928-934.
- 551 [44] V.K. Gupta, R. Singh, Partial purification and characterization of NADP⁺-isocitrate
552 dehydrogenase from immature pod walls of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Plant physiology*, 87
553 (1988) 741-741.
- 554 [45] D.F. Gómez Casati, J.I. Sesma, A.A. Iglesias, Structural and kinetic characterization of NADP-
555 dependent, non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from celery leaves,
556 *Plant Science*, 154 (2000) 107-115.
- 557 [46] G. Tanou, C. Job, L. Rajjou, E. Arc, M. Belghazi, G. Diamantidis, A. Molassiotis, D. Job,
558 Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation
559 of citrus plants to salinity, *The Plant Journal*, 60 (2009) 795-804.
- 560 [47] The Universal Protein Resource (UniProt) 2009, *Nucleic Acids Res*, 37 (2009) D169-174.
- 561 [48] J. Ren, L. Wen, X. Gao, C. Jin, Y. Xue, X. Yao, DOG 1.0: illustrator of protein domain
562 structures, *Cell research*, 19 (2009) 271-273.
- 563 [49] R. Team, others, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for
564 Statistical Computing Vienna Austria, (2010).
- 565 [50] M.C. Gerrard Wheeler, M.A. Tronconi, M.F. Drincovich, C.S. Andreo, U.I. Flügge, V.G.
566 Maurino, A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*, *Plant*
567 *physiology*, 139 (2005) 39-51.
- 568 [51] S. Wakao, C. Benning, Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in
569 *Arabidopsis*, *The Plant Journal*, 41 (2005) 243-256.
- 570 [52] I. Murgia, D. Tarantino, C. Vannini, M. Bracale, S. Carravieri, C. Soave, *Arabidopsis thaliana*
571 plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-
572 induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death, *The Plant Journal*, 38 (2004)
573 940-953.
- 574 [53] M. Arasimowicz-Jelonek, J. Floryszak-Wieczorek, A. Kosmala, Are nitric oxide donors a
575 valuable tool to study the functional role of nitric oxide in plant metabolism?, *Plant Biology*, 13
576 (2011) 747-756.
- 577 [54] H.-K. Lum, C.-H. Lee, Y.K.-C. Butt, S.C.-L. Lo, Sodium nitroprusside affects the level of
578 photosynthetic enzymes and glucose metabolism in *Phaseolus aureus* (mung bean), *Nitric Oxide*, 12
579 (2005) 220-230.
- 580 [55] D.P. Dixon, M. Skipsey, N.M. Grundy, R. Edwards, Stress-induced protein S-glutathionylation
581 in *Arabidopsis*, *Plant physiology*, 138 (2005) 2233-2244.
- 582 [56] G. Noctor, Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox
583 couples, *Plant, Cell & Environment*, 29 (2006) 409-425.
- 584

7. *CONCLUSIONS & PERSPECTIVES*

Dans la stratosphère l'ozone (O₃) fournit une protection contre les rayonnements ultraviolets aux effets létaux pour les organismes. Dans la troposphère l'O₃ est à la fois un polluant de l'air et un gaz à effet de serre contribuant activement aux changements climatiques (Forster *et al.* 2007). Les concentrations d'ozone actuelles sont en constante augmentation et constituent un réel danger non seulement pour l'homme et sa santé mais également pour les productions végétales, à l'origine de pertes économiques annuelles considérables qui s'estiment en plusieurs milliards de dollars. Depuis quelques années des indices qui se basent sur le flux d'O₃ entrant dans la feuille ont permis de définir des seuils critiques au-delà desquelles certaines doses d'O₃ peuvent induire des dommages significatifs sur des espèces de grande culture. Cependant ces indices ne prennent pas en considération la capacité de détoxification intrinsèque de chaque espèce. Cette capacité est dépendante de divers systèmes antioxydants (métabolites, enzymes) mais également de l'aptitude de la cellule à régénérer du pouvoir réducteur sous forme de NADPH. Ce pouvoir réducteur est dépendant de l'activité de plusieurs déshydrogénases dont l'implication dans la réponse à l'ozone reste à préciser.

Dans ce contexte, les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans une démarche développée par notre équipe afin d'améliorer les seuils critiques d'exposition à l'ozone. Les objectifs du travail ont été définis en rapport à trois questions :

- La différence de sensibilité à l'ozone entre des génotypes peut-elle être liée à des différences d'activité des déshydrogénases NADP-dépendantes cytosoliques?
- L'une de ces déshydrogénases à NADP aurait elle un rôle plus important que les autres en réponse à l'ozone ?
- Parmi les mécanismes post-traductionnels de régulation de la PEPC sous ozone quelle est la place du processus de nitrosylation?

Pour répondre à la première question nous avons opté pour l'utilisation du peuplier comme modèle. Cette espèce de grand intérêt économique constitue un puits important de carbone et une source importante de bois en Europe. Après un essai comparatif entre dix génotypes de peuplier hybride euraméricain soumis à une exposition chronique d'ozone (120 ppb pendant 17 jours), nous avons retenu le génotype *Robusta* et *Carpaccio* comme respectivement sensible et tolérant à l'ozone. L'un des critères retenus concernait l'abscission des feuilles, avec pour *Robusta* une accélération de la chute des feuilles en réponse à l'ozone. Lorsque l'on prend en compte le flux d'ozone entrant dans les tissus (POD₀), nous avons constaté qu'il variait très peu entre les deux génotypes, traduisant dans nos conditions expérimentales de faibles différences de conductance stomatique. Dans ces conditions nous pouvions supposer que les différences de sensibilité à l'ozone étaient plus à mettre en relation avec des différences métaboliques.

Sur les paramètres d'assimilation du dioxyde de carbone et les activités des carboxylases (Rubisco et PEPC), les deux génotypes ont montré des variations assez comparables. Concernant les déshydrogénases NADP-dépendants (enzyme malique (ME); isocitrate déshydrogénase (iCDH); glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (cGAPDH); glucose-6-phosphate déshydrogénase (cG6PDH)), une stimulation de leur activité a été constatée pour les deux génotypes en réponse au traitement ozone. Cependant, alors que les activités enzymatiques de la iCDH et de la cGAPDH évoluaient de façon similaire pour les deux génotypes, celles de la cG6PDH et de la ME étaient plus stimulées chez le génotype tolérant *Carpaccio*. Cette réponse est également associée à une plus forte corrélation entre l'augmentation de l'activité de la PEPC et l'activité de ces deux déshydrogénases pour le génotype *Carpaccio* comparé au génotype *Robusta*. Il est intéressant également de souligner que cette plus forte activité des déshydrogénases NADP-dépendantes pouvaient être mis en relation avec le maintien dans le génotype tolérant d'un niveau plus élevé en NADPH. Ces résultats vont donc dans le sens d'une plus forte capacité pour le génotype tolérant à alimenter son système antioxydant, et en particulier le cycle Halliwell-Asada, en pouvoir réducteur.

Parmi les perspectives qui se dégagent à l'issue de ce travail, nous pouvons envisager de mieux apprécier les mécanismes responsables de l'augmentation de cette activité (régulation transcriptionnelle, traductionnelle ou post-traductionnelle). Nous pouvons aussi valider l'importance de ces déshydrogénases par une approche de génétique inverse, qui permettrait de voir si la mutation de l'une de ces déshydrogénases aurait des conséquences sur la réponse de la plante à l'exposition O₃. Cette démarche a été amorcée dans la deuxième partie de mon travail et devait répondre à la deuxième question posée.

Deux mutants d'*Arabidopsis thaliana*, ont été retenus pour la seconde expérimentation : un mutant *icdh* (unique forme cytosolique) et le mutant *gr1* déficient en glutathion réductase (GR). Sur la base que l'effet de l'ozone pouvait être modulé en fonction de la durée de la photopériode, ces mutants, ainsi que l'écotype sauvage Col-0, ont été exposés à l'O₃ (350 ppb) pendant 7 h, exposition répétée sur deux ou trois jours consécutifs en fonction du cycle photopériodique. Plusieurs paramètres ont été suivis au cours de cette expérimentation (i) l'apparition de lésions, quantifiée par traitement d'image (ii) l'équilibre redox cellulaire, apprécié par le dosage des activités déshydrogénases NADP-dépendantes, des pools de pyridines nucléotides, ainsi que des teneurs en ascorbate/glutathion sous la forme oxydée et réduite, (iii) l'étude de certains marqueurs de stress / de mort cellulaire avec le suivi des transcrits de la *AtPR1* et le dosage de l'acide salicylique (SA). L'un des premiers résultats importants de cette étude est la plus forte sensibilité de l'écotype Col-0 en jours longs (16h), avec un plus grand nombre de nécroses comparé aux plantes de jours courts (8h). L'effet est d'autant plus significatif que les plantes en jours longs ont subi une durée d'exposition plus courte (1 cycle photopériodique de moins) que les plantes de jours courts. L'analyse des principaux pools de composés redox a révélé que la formation des lésions n'était pas associée avec des modifications en glutathion, ascorbate, NADP(H) ou NAD(H).

La perte de la fonction ICDH du cytosol, n'altère pas la réponse observée avec l'écotype sauvage, mais le glutathion est significativement plus oxydé. Cet effet s'accompagne d'une stimulation de l'activité des autres déshydrogénases NADP-dépendants ainsi que de l'expression du gène PR1. Avec le mutant *gr1*, l'étendue des lésions, l'accumulation d'acide salicylique, et l'induction de la PR1 sont plus faibles que pour Col-0 malgré une accumulation de glutathion notamment sous la forme réduite. L'un des résultats essentiels de ce travail nous amène à considérer que la déficience en ICDH cytosolique ne modifie que faiblement la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à l'ozone, en partie par une compensation possible de sa fonction par les autres déshydrogénases NADP-dépendantes (EM et G6PDH). Evidemment ces expérimentations ne constituent qu'une première étape dans cette démarche et l'utilisation de mutants déficients en EM ou en G6PDH compléteront notre analyse sur le rôle de ces déshydrogénases en réponse à l'ozone.

Pour répondre à la troisième question de ce travail concernant les mécanismes de régulation expliquant l'augmentation de la PEPC sous O₃, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle du NO dans la régulation de cette enzyme par une possible S-nitrosylation. Pour cette étude, l'écotype sauvage d'*Arabidopsis thaliana* (Col-0) et le mutant *rcd1*, déficient pour la synthèse de la protéine RCD1 et par ailleurs connu comme un mutant surproducteur de NO sous O₃, ont été utilisés. Nous avons pu établir que l'application de SNP (donneur de NO) sur les feuilles de Col-0 avait pour conséquence de mimer l'effet de l'exposition à l'ozone avec une stimulation de la PEPC. A l'inverse, le badigeonnage des feuilles des plantes *rcd1* avec du cPTIO+L-NNA conduit à une réduction des symptômes provoqués par l'ozone et à une inhibition du processus de stimulation de la PEPC sous ozone. En conséquence ces résultats supportent un rôle de NO *in vivo* dans l'augmentation de l'activité de la PEPC sous ozone. Enfin pour valider un éventuel effet de NO sur l'activité de la PEPC, nous avons réalisé sur des extraits protéiques de feuilles de Col-0 des essais *in vitro* de mesure d'activité de la PEPC en présence d'un donneur de NO, le GSNO. Ces essais ont confirmé l'effet stimulateur du NO sur l'activité de la PEPC. En conséquence on peut conclure qu'une partie de l'augmentation de l'activité de la PEPC sous ozone serait partiellement à attribuer à un effet direct de NO sur la protéine. Des sites de nitrosylation (prédits comme fortement probables) sur la séquence de la protéine ont d'ailleurs été identifiés au cours de ce travail. Il serait intéressant de confirmer expérimentalement ces sites, notamment par mutagénèse dirigée. Dans cette étude sur un éventuel effet de NO sur l'activité PEPC, il est intéressant d'y associer le contrôle de l'activité ME. Pour cette enzyme, dont l'activité est stimulée sous ozone ou après traitement par le SNP, nos résultats écartent un effet consécutif à une éventuelle nitrosylation de la protéine (pas d'effet *in vitro* du GSNO) au profit d'une régulation dépendante de la signalisation NO. Une telle régulation est écartée pour les autres déshydrogénases cytosoliques NADP-dépendantes. Ainsi c'est le couplage PEPC et ME qui semble sous le contrôle de NO dans la réponse des plants d'*Arabidopsis* à la contrainte ozone.

Il reste à affiner la compréhension des mécanismes de contrôle de NO sur ces enzymes et l'utilisation de chélateurs de calcium, ion divalent souvent impliqué dans la signalisation NO, pourrait permettre d'établir un éventuel lien entre NO, les variations de calcium cytosolique et l'activité de ces enzymes sous ozone.

8. *RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

- Abat JK, Deswal R** (2009) Differential modulation of S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* **9**: 4368-4380
- Ahlfors R, Brosché M, Kangasjärvi J** (2009a) Ozone and nitric oxide interaction in *Arabidopsis thaliana*: A role for ethylene? *Plant signaling & behavior* **4**: 878-878
- Ahlfors R, Brosché M, Kollist H, Kangasjärvi J** (2009b) Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **58**: 1-12
- Ainsworth EA, Rogers A, Leahey ADB** (2008) Targets for crop biotechnology in a future high-CO₂ and high-O₃ world. *Plant physiology* **147**: 13-19
- Akimoto H** (2003) Global air quality and pollution. *Science* **302**: 1716-1719
- Andersen H, Høyer PE** (1974) Simplified control experiments in the histochemical study of coenzyme-linked dehydrogenases. *Histochemistry and Cell Biology* **38**: 71-83
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Kosmala A** (2011) Are nitric oxide donors a valuable tool to study the functional role of nitric oxide in plant metabolism? *Plant Biology* **13**: 747-756
- Ashmore MR** (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell & Environment* **28**: 949-964
- Astier J, Rasul S, Koen E, Manzoor H, Besson-Bard A, Lamotte O, Jeandroz S, Durner J, Lindermayr C, Wendehenne D** (2011) S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Science* **181**: 527-533
- Avnery S, Mauzerall DL, Liu J, Horowitz LW** (2011) Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 1. Year 2000 crop production losses and economic damage. *Atmospheric Environment* **45**: 2284-2296
- Bae GY, Nakajima N, Ishizuka K, Kondo N** (1996) The Role in Ozone Phytotoxicity of the Evolution of Ethylene upon Induction of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Synthase by Ozone Fumigation in Tomato Plants. *Plant and cell physiology* **37**: 129-134
- Bagard M** (2008) Impact de l'ozone sur les processus photosynthétiques et photorespiratoires du peuplier (*Populus x canescens* [Aiton] Sm.) au cours du développement foliaire Aspects écophysologiques et cellulaires. Thèse doctorat. Université de Lorraine.
- Bagard M, Le Thiec D, Delacote E, Hasenfratz-Sauder M-P, Banvoy J, Gérard J, Dizengremel P, Jolivet Y** (2008) Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiologia Plantarum* **134**: 559-574
- Batz O, Logemann E, Reinold S, Hahlbrock K** (1998) Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Biological chemistry* **379**: 1127
- Baudouin E** (2011) The language of nitric oxide signalling. *Plant Biology* **13**: 233-242
- Baumgarten M, Huber C, Büker P, Emberson L, Dietrich H-P, Nunn AJ, Heerd C, Beudert B, Matyssek R** (2009) Are Bavarian Forests (southern Germany) at risk from ground-level ozone? Assessment using exposure and flux based ozone indices. *Environmental Pollution* **157**: 2091-2107
- Baumgarten M, Werner H, Haberle KH, Emberson LD, Fabian P, Matyssek R** (2000) Seasonal ozone response of mature beech trees (*Fagus sylvatica*) at high altitude in the Bavarian forest (Germany) in comparison with young beech grown in the field and in phytotrons. *Environmental Pollution* **109**: 431-442
- Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackener A, Inze D, Delledonne M, Van Breusegem F** (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 1352-1358
- Beligni MV, Lamattina L** (1999) Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* **208**: 337-344
- Benhar M, Forrester MT, Stamler JS** (2009) Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 721-732
- Benhar M, Stamler JS** (2005) A central role for S-nitrosylation in apoptosis. *Nature cell biology* **7**: 645-646

- Betz GA, Knappe C, Lapierre C, Olbrich M, Welzl G, Langebartels C, Heller W, Sandermann H, Ernst D** (2009) Ozone affects shikimate pathway transcripts and monomeric lignin composition in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *European Journal of Forest Research* **128**: 109-116
- Bianco R, Hynes JT** (2006) Heterogeneous reactions important in atmospheric ozone depletion: A theoretical perspective. *Accounts of chemical research* **39**: 159-165
- Black V, Black C, Roberts J, Stewart C** (2000) Tansley Review No. 115. *New Phytologist* **147**: 421-447
- Bleecker AB, Kende H** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual review of cell and developmental biology* **16**: 1-18
- Bolwell G, Wojtaszek P** (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**: 347-366
- Booker F, Muntifering R, McGrath M, Burkey K, Decoteau D, Fiscus E, Manning W, Krupa S, Chappelka A, Grantz D** (2009) The ozone component of global change: potential effects on agricultural and horticultural plant yield, product quality and interactions with invasive species. *Journal of Integrative Plant Biology* **51**: 337-351
- Booker FL, Miller JE** (1998) Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves following exposure to ozone. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1191-1202
- Bradford MM** (1976) Foreign patent documents. *Biochemistry* **72**: 248-254
- Brendan OL, Joonho P, William CP** (2011) The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochemical Journal* **436**: 15-34
- Broekaert WF, Delauré SL, De Bolle MFC, Cammue BPA** (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 393-416
- Brosché M, Kangasjärvi J** (2012) Low antioxidant concentrations impact on multiple signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* partly through NPR1. *Journal of experimental botany* **63**: 1849-1861
- Brosché M, Merilo EBE, Mayer F, Pechter P, Puzorjova I, Brader G, Kangasjärvi J, Kollist H** (2010) Natural variation in ozone sensitivity among *Arabidopsis thaliana* accessions and its relation to stomatal conductance. *Plant, Cell & Environment* **33**: 914-925
- Bustos DM, Iglesias AA** (2002) Non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is post-translationally phosphorylated in heterotrophic cells of wheat (*Triticum aestivum*). *FEBS letters* **530**: 169-173
- Cabané M, Pireaux JC, Léger E, Weber E, Dizengremel P, Pollet B, Lapierre C** (2004) Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. *Plant physiology* **134**: 586
- Cabiscol E, Levine RL** (1996) The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 4170
- Casati P, Spampinato CP, Andreo CS** (1997) Characteristics and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat. *Plant and cell physiology* **38**: 928-934
- Castagna A, Ederli L, Pasqualini S, Mensuali-Sodi A, Baldan B, Donnini S, Ranieri A** (2007) The tomato ethylene receptor LE-ETR3 (NR) is not involved in mediating ozone sensitivity: causal relationships among ethylene emission, oxidative burst and tissue damage. *New Phytologist* **174**: 342-356
- Castagna A, Nali C, Ciompi S, Lorenzini G, Soldatini G, Ranieri A** (2001) Ozone exposure affects photosynthesis of pumpkin (*Cucurbita pepo*) plants. *New Phytologist* **152**: 223-229
- Castagna A, Ranieri A** (2009) Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution Special Issue Section: Ozone and Mediterranean Ecology: Plants, People, Problems* **157**: 1461-1469
- Castillo FJ, Greppin H** (1986) Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities in *Sedum album* leaves after ozone exposure. Analysis by high-performance liquid chromatography. *Physiologia Plantarum* **68**: 201-208
- Castillo FJ, Greppin H** (1988) Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany* **28**: 231-238

- Chameides WL** (1989) The chemistry of ozone deposition to plant leaves: role of ascorbic acid. *Environmental Science & Technology* **23**: 595-600
- Chang GG, Tong L** (2003) Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry* **42**: 12721-12733
- Chen RD, Gadal P, others** (1990) Structure, functions and regulation of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenases in higher plants and in other organisms. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)* **28**: 411-427
- Cheng FY, Burkey KO, Robinson JM, Booker FL** (2007) Leaf extracellular ascorbate in relation to O₃ tolerance of two soybean cultivars. *Environmental Pollution* **150**: 355-362
- Cheng Y, Long M** (2007) A cytosolic NADP-malic enzyme gene from rice (*Oryza sativa* L.) confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Biotechnology letters* **29**: 1129-1134
- Chollet R, Vidal J, O'Leary MH** (1996) PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annual review of plant biology* **47**: 273-298
- Ciardi J, Klee H** (2001) Regulation of ethylene-mediated responses at the level of the receptor. *Annals of Botany* **88**: 813-822
- Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF** (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular plant-microbe interactions* **13**: 1380-1384
- Clayton H, Knight MR, Knight H, McAinsh MR, Hetherington AM** (1999) Dissection of the ozone-induced calcium signature. *The Plant Journal* **17**: 575-579
- Conklin PL, Pallanca JE, Last RL, Smirnoff N** (1997) L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vtc1. *Plant Physiology* **115**: 1277-1285
- Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Palma JM, Lupiáñez JA, Del Rio LA** (1999) Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Characterization and activity regulation during natural senescence. *Plant physiology* **121**: 921-928
- Craker LE** (1971) Ethylene production from ozone injured plants. *Environmental Pollution (1970)* **1**: 299-304
- D'haese D, Vandermeiren K, Asard H, Horemans N** (2005) Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* **28**: 623-632
- Danielsson H, Karlsson GP, Karlsson PE, Håkan Pleijel H** (2003) Ozone uptake modelling and flux-response relationships—an assessment of ozone-induced yield loss in spring wheat. *Atmospheric Environment* **37**: 475-485
- Davison AW, Barnes JD** (1998) Effects of ozone on wild plants. *New Phytologist* **139**: 135-151
- De Temmerman L, Karlsson GP, Donnelly A, Ojanperä K, Jäger HJ, Finnan J, Ball G** (2002) Factors influencing visible ozone injury on potato including the interaction with carbon dioxide. *European Journal of Agronomy* **17**: 291-302
- Debnam PM, Fernie AR, Leisse A, Golding A, Bowsher CG, Grimshaw C, Knight JS, Emes MJ** (2004) Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. *The Plant Journal* **38**: 49-59
- Degl'Innocenti E, Vacca C, Guidi L, Soldatini GF** (2003) CO₂ photoassimilation and chlorophyll fluorescence in two clover species showing different response to O₃. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 485-493
- Delledonne M** (2005) NO news is good news for plants. *Current opinion in plant biology* **8**: 390-396
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 13454-13454
- Després C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D, Fobert PR** (2003) The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *The Plant Cell Online* **15**: 2181-2191

- Di Baccio D, Castagna A, Paoletti E, Sebastiani L, Ranieri A** (2008) Could the differences in O₃ sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O₃ influx? *Tree physiology* **28**: 1761-1772
- Diara C, Castagna A, Baldan B, Sodi AM, Sahr T, Langebartels C, Sebastiani L, Ranieri A** (2005) Differences in the kinetics and scale of signalling molecule production modulate the ozone sensitivity of hybrid poplar clones: the roles of H₂O₂, ethylene and salicylic acid. *New phytologist* **168**: 351-364
- Dietz KJ** (2003) Plant peroxiredoxins. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 93-107
- Dixon RA, Paiva NL** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* **7**: 1085
- Dizengremel P** (2001) Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 729-742
- Dizengremel P, Le Thiec D, Bagard M, Jolivet Y** (2008) Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution* **156**: 11-15
- Dizengremel P, Le Thiec D, Hasenfratz-Sauder MP, Vaultier MN, Bagard M, Jolivet Y** (2009) Metabolic-dependent changes in plant cell redox power after ozone exposure. *Plant Biology* **11**: 35-42
- Dizengremel P, Sasek TW, Brown KJ, Richardson CJ** (1994) Ozone-Induced Changes in Primary Carbon Metabolism Enzymes of Loblolly Pine Needles. *Journal of Plant Physiology* **144**: 300-306
- Dizengremel P, Vaultier M-N, Le Thiec D, Cabané M, Bagard M, Gérant D, Gérard J, Dghim AA, Richet N, Afif D, Pireaux J-C, Hasenfratz-Sauder M-P, Jolivet Y** (2012) Phosphoenolpyruvate is at the crossroads of leaf metabolic responses to ozone stress. *New Phytologist* **195**: 512-517
- Dong X** (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 316-323
- Doubnerová V, Müller K, Čeřovská N, Synková H, Spoustová P, Ryšlavá H** (2009) Effect of Potato Virus Y on the NADP-Malic Enzyme from *Nicotiana tabacum* L.: mRNA, Expressed Protein and Activity. *International journal of molecular sciences* **10**: 3583-3598
- Drincovich MF, Casati P, Andreo CS** (2001) NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS letters* **490**: 1-6
- Eastmond PJ, Dennis DT, Rawsthorne S** (1997) Evidence that a malate/inorganic phosphate exchange translocator imports carbon across the leucoplast envelope for fatty acid synthesis in developing castor seed endosperm. *Plant physiology* **114**: 851-856
- Echevarria C, Pacquit V, Bakrim N, Osuna L, Delgado B, Arrio-Dupont M, Vidal J** (1994) The effect of pH on the covalent and metabolic control of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum* leaf. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **315**: 425-430
- Ederli L, Morettini R, Borgogni A, Wasternack C, Miersch O, Reale L, Ferranti F, Tosti N, Pasqualini S** (2006) Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant physiology* **142**: 595-608
- Edwards G, Andreo C** (1992) NADP-malic enzyme from plants. *Phytochemistry* **31**: 1845
- Ehhalt D, Prather M, Dentener F, Derwent R, Dlugokencky EJ, Holland E, Isaksen I, Katima J, Kirchhoff V, Matson P, others** (2001) Atmospheric chemistry and greenhouse gases. *In*. Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Richland, WA (US)
- Eller AS, Sparks JP** (2006) Predicting leaf-level fluxes of O₃ and NO₂: the relative roles of diffusion and biochemical processes. *Plant, Cell & Environment* **29**: 1742-1750
- Emberson LD, Ashmore MR, Cambridge HM, Simpson D, Tuovinen JP** (2000) Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environmental Pollution* **109**: 403-413
- Emes M, Neuhaus H** (1997) Metabolism and transport in non-photosynthetic plastids. *Journal of experimental botany* **48**: 1995-2005
- Ettema TJG, Makarova KS, Jellema GL, Gierman HJ, Koonin EV, Huynen MA, De Vos WM, Van Der Oost J** (2004) Identification and functional verification of archaeal-type phosphoenolpyruvate carboxylase, a missing link in archaeal central carbohydrate metabolism. *Journal of bacteriology* **186**: 7754-7762

- Evans NH, McAinsh MR, Hetherington AM, Knight MR** (2005) ROS perception in *Arabidopsis thaliana*: the ozone-induced calcium response. *The Plant Journal* **41**: 615-626
- Fares A, Rossignol M, Peltier JB** (2011) Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*
- Feder W, Shrier R** (1990) Combination of UV-B. and ozone reduces pollen tube growth more than either stress alone. *Environmental and Experimental Botany* **30**: 451-454
- Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ** (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Science's STKE* **102**: 8054
- Felzer BS, Cronin T, Reilly JM, Melillo JM, Wang X** (2007) Impacts of ozone on trees and crops. *Comptes Rendus Geoscience* **339**: 784-798
- Feng Y, Komatsu S, Furukawa T, Koshiba T, Kohno Y** (2008) Proteome analysis of proteins responsive to ambient and elevated ozone in rice seedlings. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **125**: 255-265
- Feng Z, Wang S, Szantoi Z, Chen S, Wang X** (2010) Protection of plants from ambient ozone by applications of ethylenediurea (EDU): A meta-analytic review. *Environmental Pollution* **158**: 3236-3242
- Fernie AR, Schauer N** (2009) Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends in Genetics* **25**: 39-48
- Fickenscher K, Scheibe R** (1986) Purification and properties of the cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves. *Archives of biochemistry and biophysics* **247**: 393-402
- Fieuw S, Muller-Rober B, Galvez S, Willmitzer L** (1995) Cloning and expression analysis of the cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from potato (implications for nitrogen metabolism). *Plant physiology* **107**: 905-913
- Fiscus EL, Booker FL, Burkey KO** (2005) Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell & Environment* **28**: 997-1011
- Fontaine V, Pelloux J, Podor M, Afif D, Gérant D, Grieu P, Dizengremel P** (1999) Carbon fixation in *Pinus halepensis* submitted to ozone. Opposite response of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase. *Physiologia Plantarum* **105**: 187-192
- Foyer C, Descourvieres P, Kunert K** (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell & Environment* **17**: 507-523
- Fratelli M, Demol H, Puype M, Casagrande S, Eberini I, Salmona M, Bonetto V, Mengozzi M, Duffieux F, Miclet E** (2002) Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 3505
- Fuhrer J** (2009) Ozone risk for crops and pastures in present and future climates. *Naturwissenschaften* **96**: 173-194
- Fuhrer J, Skärby L, Ashmore MR** (1997) Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environmental Pollution* **97**: 91-106
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-756
- Gallardo F, Gálvez S, Gadal P, Cánovas FM** (1995) Changes in NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase during tomato fruit ripening. *Planta* **196**: 148-154
- Gálvez S, Bismuth E, Sarda C, Gadal P** (1994) Purification and characterization of chloroplastic NADP-isocitrate dehydrogenase from mixotrophic tobacco cells (comparison with the cytosolic isoenzyme). *Plant physiology* **105**: 593-600
- Gálvez S, Hodges M, Decottignies P, Bismuth E, Lancien M, Sangwan RS, Dubois F, LeMaréchal P, Créatin C, Gadal P** (1996) Identification of a tobacco cDNA encoding a cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase. *Plant molecular biology* **30**: 307-320
- Gálvez S, Roche O, Bismuth E, Brown S, Gadal P, Hodges M** (1998) Mitochondrial localization of a NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzyme by using the green fluorescent protein as a marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 7813

- Gaucher C, Costanzo N, Afif D, Mauffette Y, Chevrier N, Dizengremel P** (2003) The impact of elevated ozone and carbon dioxide on young *Acer saccharum* seedlings. *Physiologia Plantarum* **117**: 392-402
- Gaucher C, Costanzo N, Widden P, Renaud JP, Dizengremel P, Mauffette Y, Chevrier N** (2006) Response to an ozone gradient of growth and enzymes implicated in tolerance to oxidative stress in *Acer saccharum* (Marsh.) seedlings. *Annals of forest science* **63**: 387-397
- Gerrard Wheeler MC, Arias CL, Maurino VG, Andreo CS, Drincovich MF** (2009) Identification of domains involved in the allosteric regulation of cytosolic *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzymes. *Febs J* **276**: 5665-5677
- Gerrard Wheeler MC, Arias CL, Tronconi MA, Maurino VG, Andreo CS, Drincovich MF** (2008) *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzyme isoforms: high degree of identity but clearly distinct properties. *Plant molecular biology* **67**: 231-242
- Gerrard Wheeler MCG, Tronconi MA, Drincovich MF, Andreo CS, Flügge UI, Maurino VG** (2005) A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*. *Plant physiology* **139**: 39-51
- Givan CV** (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biological reviews* **74**: 277-309
- Gómez Casati DF, Sesma JI, Iglesias AA** (2000) Structural and kinetic characterization of NADP-dependent, non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from celery leaves. *Plant Science* **154**: 107-115
- Grantz D, Gunn S, VU HB** (2006) O₃ impacts on plant development: a meta-analysis of root/shoot allocation and growth. *Plant, Cell & Environment* **29**: 1193-1209
- Grantz DA** (2003) Ozone impacts on cotton: towards an integrated mechanism. *Environmental Pollution* **126**: 331-344
- Gravano E, Bussotti F, Strasser RJ, Schaub M, Novak K, Skelly J, Tani C** (2004) Ozone symptoms in leaves of woody plants in open-top chambers: ultrastructural and physiological characteristics. *Physiologia Plantarum* **121**: 620-633
- Grennan AK** (2007) Protein S-nitrosylation: potential targets and roles in signal transduction. *Plant Physiol* **144**: 1237-1239
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J** (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 507-516
- Grünhage L, Krause GHM, Köllner B, Bender J, Weigel HJ, Jäger HJ, Guderian R** (2001) A new flux-orientated concept to derive critical levels for ozone to protect vegetation. *Environmental Pollution* **111**: 355-362
- Grünhage L, Krupa SV, Legge AH, Jäger HJ** (2004) Ambient flux-based critical values of ozone for protecting vegetation: differing spatial scales and uncertainties in risk assessment. *Atmospheric Environment* **38**: 2433-2437
- Guidi L, Degl'Innocenti E, Martinelli F, Piras M** (2009) Ozone effects on carbon metabolism in sensitive and insensitive *Phaseolus* cultivars. *Environmental and Experimental Botany* **66**: 117-125
- Guidi L, Nali C, Lorenzini G, Filippi F, Soldatini G** (2001) Effect of chronic ozone fumigation on the photosynthetic process of poplar clones showing different sensitivity. *Environmental pollution* **113**: 245-254
- Gupta VK, Singh R** (1988) Partial purification and characterization of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase from immature pod walls of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant physiology* **87**: 741-741
- Haagen-Smit A, Darley EF, Zaitlin M, Hull H, Noble W** (1952) Investigation on injury to plants from air pollution in the Los Angeles area. *Plant Physiology* **27**: 18
- Habenicht A** (1997) The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemistry, structure, occurrence and evolution. *Biological Chemistry* **378**: 1413-1419
- Habenicht A, Quesada A, Cerff R** (1997) Sequence of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana plumbaginifolia* and phylogenetic origin of the gene family. *Gene* **198**: 237-243

- 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 Physiology* **103**: 1147-1154
- Harmens H, Mills G, Hayes F, Norris D** (2010) Air Pollution and Vegetation: ICP Vegetation Annual Report 2009/2010. NERC/Centre for Ecology & Hydrology
- Heath RL** (2008) Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change? *Environmental Pollution* **155**: 453-463
- Heath RL, Lefohn AS, Musselman RC** (2009) Temporal processes that contribute to nonlinearity in vegetation responses to ozone exposure and dose. *Atmospheric Environment* **43**: 2919-2928
- Helmig D, Oltmans SJ, Carlson D, Lamarque J-F, Jones A, Labuschagne C, Anlauf K, Hayden K** (2007) A review of surface ozone in the polar regions. *Atmospheric Environment* **41**: 5138-5161
- Hibberd JM, Covshoff S** (2010) The regulation of gene expression required for C4 photosynthesis. *Annual review of plant biology* **61**: 181-207
- Hodges M** (2002) Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *Journal of experimental botany* **53**: 905-916
- Hodges M, Flesch V, Gálvez S, Bismuth E** (2003) Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 577-585
- Holland M, Kinghorn S, Emberson L, Cinderby S, Ashmore M, Mills G, Harmens H** (2006) Development of a framework for probabilistic assessment of the economic losses caused by ozone damage to crops in Europe.
- Hollósy F** (2002) Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* **33**: 179-197
- Hormaza J, Herrero M** (1996) Male gametophytic selection as a plant breeding tool. *Scientia horticultrae* **65**: 321-333
- Huang X, von Rad U, Durner J** (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* **215**: 914-923
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1606**: 117-125
- Igawa T, Fujiwara M, Tanaka I, Fukao Y, Yanagawa Y** (2010) Characterization of bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase expressed in male gametophyte of higher plants. *BMC plant biology* **10**: 200
- IPCC CC** (2001) The scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press: Cambridge, United Kingdom: 881
- Ishizaki Kanna M, Aono M, Saji H** (2004) Role of phytohormones in response of plants to ozone and other environmental pollutants. *Regulation of Plant Growth and Development* **39**
- Izui K, Matsumura H, Furumoto T, Kai Y** (2004) Phospho enol pyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 69-84
- Jenkin ME, Clemitshaw KC** (2000) Ozone and other secondary photochemical pollutants: chemical processes governing their formation in the planetary boundary layer. *Atmospheric Environment* **34**: 2499-2527
- Ji Y, Toader V, Bennett BM** (2002) Regulation of microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities by S-nitrosylation. *Biochemical pharmacology* **63**: 1397-1404
- Jimenez A, Hernandez JA, del Río LA, Sevilla F** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant physiology* **114**: 275-284
- Kadono T, Yamaguchi Y, Furuichi T, Hirono M, Garrec JP, Kawano T** (2006) Ozone-induced cell death mediated with oxidative and calcium signaling pathways in tobacco Bel-W3 and Bel-B cell suspension cultures. *Plant signaling & behavior* **1**: 312
- Kangasjärvi J, Jaspers P, Kollist H** (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1021-1036

- Kangajärvi J, Jaspers P, Kollist H** (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1021-1036
- Karlsson PE, Braun S, Broadmeadow M, Elvira S, Emberson L, Gimeno BS, Le Thiec D, Novak K, Oksanen E, Schaub M, Uddling J, Wilkinson M** (2007) Risk assessments for forest trees: The performance of the ozone flux versus the AOT concepts. *Environmental Pollution* **146**: 608-616
- Karlsson PE, Medin EL, Ottosson S, Sellden G, Wallin G, Pleijel H, Skarby L** (2004) A cumulative ozone uptake-response relationship for the growth of Norway spruce saplings. *Environmental Pollution* **128**: 405-417
- Karlsson PE, Uddling J, Braun S, Broadmeadow M, Elvira S, Gimeno BS, Le Thiec D, Oksanen E, Vandermeiren K, Wilkinson M, Emberson L** (2004) New critical levels for ozone effects on young trees based on AOT40 and simulated cumulative leaf uptake of ozone. *Atmospheric Environment* **38**: 2283-2294
- Karnosky D, Pregitzer KS, Zak DR, Kubiske ME, Hendrey G, Weinstein D, Nosal M, Percy K** (2005) Scaling ozone responses of forest trees to the ecosystem level in a changing climate. *Plant, Cell & Environment* **28**: 965-981
- Karnosky DF, Gagnon ZE, Dickson RE, Coleman MD, Isebrands JG, Lee EH** (1996) Changes in growth, leaf abscission, and biomass associated with seasonal tropospheric ozone exposures of *Populus tremuloides* clones and seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* **26**: 23-37
- Karnosky DF, Skelly JM, Percy KE, Chappelka AH** (2007) Perspectives regarding 50 years of research on effects of tropospheric ozone air pollution on US forests. *Environmental Pollution* **147**: 489-506
- Kelly G, Gibbs M** (1973) Nonreversible D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of plant tissues. *Plant physiology* **52**: 111
- Kerstiens G, Lenzian KJ** (1989) Interactions between ozone and plant cuticles. *New Phytologist* **112**: 21-27
- Kim JG, Yousef AE, Khadre MA** (2003) Ozone and its current and future application in the food industry. *Advances in food and nutrition research* **45**: 167-218
- Koch JR, Creelman RA, Eshita SM, Seskar M, Mullet JE, Davis KR** (2000) Ozone sensitivity in hybrid poplar correlates with insensitivity to both salicylic acid and jasmonic acid. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol* **123**: 487-496
- Kollist H, Moldau H, Mortensen L, Rasmussen SK, Jørgensen LB** (2000) Ozone Flux to Plasmalemma in Barley and Wheat is controlled by Stomata rather than by direct Reaction of Ozone with Cell Wall Ascorbate. *Journal of Plant Physiology* **156**: 645-651
- Krantev A, Yordanova R, Janda T, Szalai G, Popova L** (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of plant physiology* **165**: 920-931
- Kuncewicz T, Sheta EA, Goldknopf IL, Kone BC** (2003) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in mesangial cells. *Molecular & Cellular Proteomics* **2**: 156-163
- Laisk A, Kull O, Moldau H** (1989) Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiology* **90**: 1163-1163
- Langebartels C, Wohlgemuth H, Kschieschan S, Grün S, Sandermann H** (2002) Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 567-575
- Laporte MM, Shen B, Tarczynski MC** (2002) Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *Journal of Experimental Botany* **53**: 699-705
- Lawler JM, Song W** (2002) Specificity of antioxidant enzyme inhibition in skeletal muscle to reactive nitrogen species donors. *Biochemical and biophysical research communications* **294**: 1093-1100
- Lee BS, Wang JL** (2006) Concentration variation of isoprene and its implications for peak ozone concentration. *Atmospheric environment* **40**: 5486-5495
- Lee YC, Calori G, Hills P, Carmichael GR** (2002) Ozone episodes in urban Hong Kong 1994–1999. *Atmospheric Environment* **36**: 1957-1968
- Lefohn AS, Shadwick D, Oltmans SJ** (2010) Characterizing changes in surface ozone levels in metropolitan and rural areas in the United States for 1980–2008 and 1994–2008. *Atmospheric Environment* **44**: 5199-5210

- Leisner CP, Ainsworth EA** (2011) Quantifying the effects of ozone on plant reproductive growth and development. *Global Change Biology*
- Lendzian K, Bassham JA** (1975) Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribulose 1, 5-diphosphate and NADPH/NADP⁺ ratios. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **396**: 260-275
- León J, Yalpani N, Raskin I, Lawton MA** (1993) Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant physiology* **103**: 323-328
- Lepistö A, Kangasjärvi S, Luomala EM, Brader G, Sipari N, Keränen M, Keinänen M, Rintamäki E** (2009) Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **149**: 1261-1276
- Leterrier M, Chaki M, Airaki M, Valderrama R, Palma JM, Barroso JB, Corpas FJ** (2011) Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 789
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Li H, Xing X, Ding G, Li Q, Wang C, Xie L, Zeng R, Li Y** (2009) SysPTM: a systematic resource for proteomic research on post-translational modifications. *Molecular & Cellular Proteomics* **8**: 1839-1849
- Lindermayr C, Durner J** (2009) S-Nitrosylation in plants: pattern and function. *Journal of proteomics* **73**: 1-9
- Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J** (2006) Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 4285-4291
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**: 921-930
- Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE, Que LG** (2004) Essential Roles of S-Nitrosothiols in Vascular Homeostasis and Endotoxic Shock. *Cell* **116**: 617-628
- Liu Y, Wu R, Wan Q, Xie G, Bi Y** (2007) Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots. *Plant and cell physiology* **48**: 511-522
- Liu Y, Zhang S** (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science's STKE* **16**: 3386
- Loreto F, Fares S** (2007) Is ozone flux inside leaves only a damage indicator? Clues from volatile isoprenoid studies. *Plant Physiology* **143**: 1096-1100
- Loreto F, Mannozi M, Maris C, Nascetti P, Ferranti F, Pasqualini S** (2001) Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology* **126**: 993-1000
- Luwe MWF, Takahama U, Heber U** (1993) Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiology* **101**: 969-976
- Magel E, Mayrhofer S, Müller A, Zimmer I, Hampp R, Schnitzler JP** (2006) Photosynthesis and substrate supply for isoprene biosynthesis in poplar leaves. *Atmospheric Environment* **40**: 138-151
- Mahalingam R, Shah N, Scrymgeour A, Fedoroff N** (2005) Temporal evolution of the *Arabidopsis* oxidative stress response. *Plant molecular biology* **57**: 709-730
- Marcus Y, Altman-Gueta H, Finkler A, Gurevitz M** (2003) Dual role of cysteine 172 in redox regulation of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and degradation. *Journal of bacteriology* **185**: 1509-1517
- Martinoia E, Rentsch D** (1994) Malate compartmentation-responses to a complex metabolism. *Annual Review of Plant Biology* **45**: 447-467
- Masclaux C, Valadier MH, Brugière N, Morot-Gaudry JF, Hirel B** (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**: 510-518
- Matyssek R, Bytnerowicz A, Karlsson PE, Paoletti E, Sanz M, Schaub M, Wieser G** (2007) Promoting the O₃ flux concept for European forest trees. *Environmental Pollution* **146**: 587-607

- Matyssek R, Wieser G, Calfapietra C, de Vries W, Dizengremel P, Ernst D, Jolivet Y, Mikkelsen TN, Mohren GMJ, Le Thiec D, Tuovinen JP, Weatherall A, Paoletti E** (2012) Forests under climate change and air pollution: Gaps in understanding and future directions for research. *Environmental Pollution* **160**: 57-65
- Matyssek R, Wieser G, Nunn AJ, Kozovits AR, Reiter IM, Heerdt C, Winkler JB, Baumgarten M, Häberle KH, Grams TEE, Werner H, Fabian P, Havranek WM** (2004) Comparison between AOT40 and ozone uptake in forest trees of different species, age and site conditions. *Atmospheric Environment* **38**: 2271-2281
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ** (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell Online* **8**: 203-212
- Maurino VG, Gerrard Wheeler MC, Andreo CS, Drincovich MF** (2009) Redundancy is sometimes seen only by the uncritical: Does *Arabidopsis* need six malic enzyme isoforms? *Plant Science* **176**: 715-721
- Maurino VG, Saigo M, Andreo CS, Drincovich MF** (2001) Non-photosynthetic malic enzyme from maize: a constitutively expressed enzyme that responds to plant defence inducers. *Plant molecular biology* **45**: 409-420
- McAinsh MR, Evans NH, Montgomery LT, North KA** (2002) Calcium signalling in stomatal responses to pollutants. *New Phytologist* **153**: 441-447
- McKee I, Long S** (2001) Plant growth regulators control ozone damage to wheat yield. *New Phytologist* **152**: 41-51
- Mehlhorn H** (1990) Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. *Plant, Cell & Environment* **13**: 971-976
- Mehlhorn H, O'shea JM, Wellburn AR** (1991) Atmospheric ozone interacts with stress ethylene formation by plants to cause visible plant injury. *Journal of experimental botany* **42**: 17-24
- Mehlhorn H, Wellburn AR** (1987) Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. *Nature* **327**: 417-418
- Mhamdi A, Hager J, Chaouch S, Queval G, Han Y, Taconnat L, Saindrenan P, Gouia H, Issakidis-Bourguet E, Renou JP, others** (2010a) *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant physiology* **153**: 1144-1160
- Mhamdi A, Mauve C, Gouia H, Saindrenan P, Hodges M, Noctor G** (2010b) Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1112-1123
- Miles GP, Samuel MA, Zhang Y, Ellis BE** (2005) RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environmental Pollution* **138**: 230-237
- Mills G, Hayes F, Simpson D, Emberson L, Norris D, Harmens H, Büker P** (2011) Evidence of widespread effects of ozone on crops and (semi-) natural vegetation in Europe (1990–2006) in relation to AOT40- and flux-based risk maps. *Global Change Biology* **17**: 592-613
- Mittler R, Zilinskas BA** (1991) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant physiology* **97**: 962
- Miyake C, Asada K** (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology* **33**: 541-553
- Møller IM, Rasmusson AG** (1998) The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends in plant science* **3**: 21-27
- Motohashi K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T** (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 11224
- Mulholland B, Craigan J, Black C, Colls J, Atherton J, Landon G** (1998) Effects of elevated CO₂ and O₃ on the rate and duration of grain growth and harvest index in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Global Change Biology* **4**: 627-635

- Musselman RC, Lefohn AS, Massman WJ, Heath RL** (2006) A critical review and analysis of the use of exposure- and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. *Atmospheric Environment* **40**: 1869-1888
- Nali C, Guidi L, Filippi F, Soldatini G, Lorenzini G** (1998) Photosynthesis of two poplar clones contrasting in O₃ sensitivity. *Trees-Structure and Function* **12**: 196-200
- Nali C, Pucciariello C, Mills G, Lorenzini G** (2005) On the different sensitivity of white clover clones to ozone: Physiological and biochemical parameters in a multivariate approach. *Water, Air, & Soil Pollution* **164**: 137-153
- Nawrath C, Métraux JP** (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell Online* **11**: 1393-1404
- Nemoto Y, Sasakuma T** (2002) Differential stress responses of early salt-stress responding genes in common wheat. *Phytochemistry* **61**: 129-133
- Nimmo HG** (2000) The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends in Plant Science* **5**: 75-80
- Noctor G** (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, cell & environment* **29**: 409-425
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology* **49**: 249-279
- Nunn AJ, Kozovits AR, Reiter IM, Heerdt C, Leuchner M, Lütz C, Liu X, Lo WM, Winkler JB, Grams TEE, Häberle KH, Werner H, Fabian P, Rennenberg H, Matyssek R** (2005) Comparison of ozone uptake and sensitivity between a phytotron study with young beech and a field experiment with adult beech (*Fagus sylvatica*). *Environmental Pollution* **137**: 494-506
- Ogawa D** (2006) Studies on The Pathway and Regulation of Salicylic Acid Biosynthesis in Ozone-Exposed Plants.
- Ogawa K** (2005) Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxidants & redox signaling* **7**: 973-981
- Okano K, Ito O, Takeba G, Shimizu A, Totsuka T** (1984) ALTERATION OF 13C-ASSIMILATE PARTITIONING IN PLANTS OF PHASEOLUS VULGARIS EXPOSED TO OZONE. *New phytologist* **97**: 155-163
- Oksanen E, Holopainen T** (2001) Responses of two birch (*Betula pendula* Roth) clones to different ozone profiles with similar AOT40 exposure. *Atmospheric Environment* **35**: 5245-5254
- Oltmans SJ, Lefohn AS, Harris JM, Galbally I, Scheel HE, Bodeker G, Brunke E, Claude H, Tarasick D, Johnson BJ, Simmonds P, Shadwick D, Anlauf K, Hayden K, Schmidlin F, Fujimoto T, Akagi K, Meyer C, Nichol S, Davies J, Redondas A, Cuevas E** (2006) Long-term changes in tropospheric ozone. *Atmospheric Environment* **40**: 3156-3173
- Ortega-Galisteo AP, Rodríguez-Serrano M, Pazmiño DM, Gupta DK, Sandalio LM, Romero-Puertas MC** (2012) S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*
- Örvar BL, McPherson J, Ellis BE** (1997) Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. *The Plant Journal* **11**: 203-212
- Overmyer K, Brosché M, Pellinen R, Kuittinen T, Tuominen H, Ahlfors R, Keinänen M, Saarma M, Scheel D, Kangasjärvi J** (2005) Ozone-induced programmed cell death in the *Arabidopsis* radical-induced cell death1 mutant. *Plant Physiology* **137**: 1092-1104
- Overmyer K, Kollist H, Tuominen H, Betz C, Langebartels C, Wingsle G, Kangasjärvi S, Brader G, Mullineaux P, Kangasjärvi J** (2008) Complex phenotypic profiles leading to ozone sensitivity in *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant, Cell & Environment* **31**: 1237-1249

- Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H, Kangasjärvi J** (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *The Plant Cell Online* **12**: 1849-1862
- Palmieri MC, Lindermayr C, Bauwe H, Steinhauser C, Durner J** (2010) Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation. *Plant physiology* **152**: 1514-1528
- Paoletti E, Manning WJ** (2007) Toward a biologically significant and usable standard for ozone that will also protect plants. *Environmental Pollution* **150**: 85-95
- Parani M, Rudrabhatla S, Myers R, Weirich H, Smith B, Leaman DW, Goldman SL** (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* **2**: 359-366
- Pascual MB, Molina-Rueda JJ, Cánovas FM, Gallardo F** (2008) Spatial distribution of cytosolic NADP⁺-isocitrate dehydrogenase in pine embryos and seedlings. *Tree physiology* **28**: 1773-1782
- Pasqualini S, Batini P, Ederli L, Porceddu A, Piccioni C, De Marchis F, Antonielli M** (2001) Effects of short-term ozone fumigation on tobacco plants: response of the scavenging system and expression of the glutathione reductase. *Plant, Cell & Environment* **24**: 245-252
- Pasqualini S, Della Torre G, Ferranti F, Ederli L, Piccioni C, Reale L, Antonielli M** (2002) Salicylic acid modulates ozone-induced hypersensitive cell death in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* **115**: 204-212
- Pasqualini S, Piccioni C, Reale L, Ederli L, Della Torre G, Ferranti F** (2003) Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* **133**: 1122-1134
- Pell E, Eckardt N, Enyedi A** (1992) Timing of ozone stress and resulting status of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytologist* **120**: 397-405
- Pellinen R, Palva T, Kangasjarvi J** (1999) Short communication: subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J* **20**: 349-356
- Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M** (2004) *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**: 2785-2794
- Percy KE, Manninen S, Haberle KH, Heerdt C, Werner H, Henderson GW, Matyssek R** (2009) Effect of 3 years' free-air exposure to elevated ozone on mature Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) needle epicuticular wax physicochemical characteristics. *In Environmental Pollution, Vol 157*, pp 1657-1665
- Peters JL, Castillo FJ, Heath RL** (1989) Alteration of extracellular enzymes in pinto bean leaves upon exposure to air pollutants, ozone and sulfur dioxide. *Plant Physiology* **89**: 159
- Pitel JA, Cheliak WM** (1986) Effectiveness of protective agents for increasing activity of five enzymes from vegetative tissues of white spruce. *Canadian journal of botany* **64**: 39-44
- Plaxton WC** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual review of plant biology* **47**: 185-214
- Plaxton WC, Podestá FE** (2006) The functional organization and control of plant respiration. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**: 159-198
- Pleijel H** (2011) Reduced ozone by air filtration consistently improved grain yield in wheat. *Environmental Pollution* **159**: 897-902
- Pleijel H, Danielsson H, Emberson L, Ashmore MR, Mills G** (2007) Ozone risk assessment for agricultural crops in Europe: Further development of stomatal flux and flux-response relationships for European wheat and potato. *Atmospheric Environment* **41**: 3022-3040
- Pleijel H, Danielsson H, Karlsson GP, Gelang J, Karlsson PE, Selliden G** (2000) An ozone flux-response relationship for wheat. *Environmental Pollution* **109**: 453-462
- Pupillo P, Faggiani R** (1979) Subunit structure of three glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases of some flowering plants. *Archives of biochemistry and biophysics* **194**: 581-592
- Ranieri A, Castagna A, Amoroso S, Nali C, Lorenzini G, Soldatini G** (1998) Ascorbate levels and ascorbate peroxidase activation in two differently sensitive poplar clones as a result of ozone fumigation. *Responses of Plant Metabolism To Air Pollution and Global Change* (De Kok LJ, Stulen I eds). Backhuys Publishers, Leiden: 435-438

- Ranieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, Sodi AM, Soldatini G** (2003) Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2529-2540
- Ranieri A, Castagna A, Padu E, Moldau H, Rahi M, Soldatini G** (1999) The Decay of O₃ through Direct Reaction with Cell Wall Ascorbate is not Sufficient to Explain the Different Degrees of O₃ sensitivity in two Poplar Clones. *Journal of plant physiology* **154**: 250-255
- Ranieri A, D'Urso G, Nali C, Lorenzini G, Soldatini GF** (1996) Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiologia Plantarum* **97**: 381-387
- Rao MV, Davis KR** (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *The Plant Journal* **17**: 603-614
- Rao MV, Koch JR, Davis KR** (2000) Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biology* **44**: 345-358
- Rao MV, Lee H, Creelman RA, Mullet JE, Davis KR** (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell Online* **12**: 1633-1646
- Rao MV, Lee H, Davis KR** (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *The Plant Journal* **32**: 447-456
- Reich PB** (1987) Quantifying plant response to ozone: a unifying theory. *Tree Physiology* **3**: 63-91
- Rhee KY, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan CF** (2005) S-nitroso proteome of Mycobacterium tuberculosis: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 467
- Rizzo M, Bernardi R, Salvini M, Nali C, Lorenzini G, Durante M** (2007) Identification of differentially expressed genes induced by ozone stress in sensitive and tolerant poplar hybrids. *Journal of plant physiology* **164**: 945-949
- Romero-Puertas MC, Campostrini N, Matte A, Righetti PG, Perazzolli M, Zolla L, Roepstorff P, Delledonne M** (2008) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**: 1459-1469
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AM, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M** (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**: 4120-4130
- Rubin MB** (2001) The history of ozone: the Schönbein period, 1839–1868. *Bull. Hist. Chem* **26**: 40-56
- Rumpho ME, Edwards GE, Loescher WH** (1983) A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves: activity and localization of key enzymes. *Plant physiology* **73**: 869
- Rustérucci C, Espunya MC, Díaz M, Chabannes M, Martínez MC** (2007) S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant physiology* **143**: 1282-1292
- Sanchez R, Cejudo FJ** (2003) Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* **132**: 949-957
- Sano S, Asada K** (1994) cDNA cloning of monodehydroascorbate radical reductase from cucumber: a high degree of homology in terms of amino acid sequence between this enzyme and bacterial flavoenzymes. *Plant and cell physiology* **35**: 425-437
- Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kaneko T, Awai K, Amagai M, Kuwata C, Tsugane T, Masuda T** (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *Dna Research* **8**: 153-161
- Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakurai N, Suzuki H, Hirai MY, Noji M, Saito K, others** (2005) Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **44**: 653-668

- Scebba F, Pucciarelli I, Soldatini G, Ranieri A** (2003) O₃ induced changes in the antioxidant systems and their relationship to different degrees of susceptibility of two clover species. *Plant Science* **165**: 583-593
- Schaaf J, Walter MH, Hess D** (1995) Primary metabolism in plant defense (regulation of a bean malic enzyme gene promoter in transgenic tobacco by developmental and environmental cues). *Plant physiology* **108**: 949-960
- 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. *The Plant Cell Online* **9**: 783-798
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 11655
- Schlaghaufer CD, Arteca RN, others** (1997) Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* **100**: 264-273
- Schnarrenberger C, Flechner A, Martin W** (1995) Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves. *Plant physiology* **108**: 609-614
- Schnarrenberger C, Oeser A, Tolbert N** (1973) Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Archives of biochemistry and biophysics* **154**: 438-448
- Šebela M, Radová A, Angelini R, Tavladoraki P, Frébort I, Peč P** (2001) FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**: 197-207
- Seth D, Stamler JS** (2011) The SNO-proteome: causation and classifications. *Current opinion in chemical biology* **15**: 129-136
- Shorosh BS, Dixon RA** (1992) Molecular characterization and expression of an isocitrate dehydrogenase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant molecular biology* **20**: 801-807
- Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semane B, Hoet P, Van Laere A, Vangronsveld J** (2005) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 437-444
- Smith RG, Gauthier DA, Dennis DT, Turpin DH** (1992) Malate- and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. *Plant physiology* **98**: 1233
- Society R, Fowler D** (2008) Ground-level ozone in the 21st century: future trends, impacts and policy implications. The Royal Society
- Stamler JS, Toone EJ, Lipton SA, Sucher NJ** (1997) (S) NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* **18**: 691-696
- Svensson P, Bliźsing OE, Westhoff P** (2003) Evolution of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **414**: 180-188
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010) Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in plant science* **15**: 462-470
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X** (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science's STKE* **321**: 952
- Tamaoki M** (2008) The role of phytohormone signaling in ozone-induced cell death in plants. *Plant signaling & behavior* **3**: 166
- Tamaoki M, Matsuyama T, Kanna M, Nakajima N, Kubo A, Aono M, Saji H** (2003) Differential ozone sensitivity among *Arabidopsis* accessions and its relevance to ethylene synthesis. *Planta* **216**: 552-560
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S** (2005) Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**: 2337-2343

- Tanou G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghazi M, Diamantidis G, Molassiotis A, Job D** (2009) Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *The Plant Journal* **60**: 795-804
- Tausz M, Grulke NE, Wieser G** (2007) Defense and avoidance of ozone under global change. *Environmental Pollution* **147**: 525-531
- Team R, others** (2010) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria
- Thom E, Möhlmann T, Quick WP, Camara B, Neuhaus HE** (1998) Sweet pepper plastids: enzymic equipment, characterisation of the plastidic oxidative pentose-phosphate pathway, and transport of phosphorylated intermediates across the envelope membrane. *Planta* **204**: 226-233
- Timonen U, Huttunen S, Manninen S** (2004) Ozone sensitivity of wild field layer plant species of northern Europe. A review. *Plant Ecology* **172**: 27-39
- Tingey DT, Standley C, Field RW** (1976) Stress ethylene evolution: A measure of ozone effects on plants. *Atmospheric Environment* (1967) **10**: 969-974
- Torsethaugen G, Pell EJ, Assmann SM** (1999) Ozone inhibits guard cell K⁺ channels implicated in stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 13577
- Tosti N, Pasqualini S, Borgogni A, Ederli L, Falistocco E, Crispi S, Paolucci F** (2006) Gene expression profiles of O₃-treated *Arabidopsis* plants. *Plant, cell & environment* **29**: 1686-1702
- Tsuchisaka A, Theologis A** (2004) Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology* **136**: 2982-3000
- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GFE** (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and cell physiology* **47**: 346-354
- Tuomainen J, Betz C, Kangasjärvi J, Ernst D, Yin ZH, Langebartels C, Sandermann Jr H** (1997) Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *The Plant Journal* **12**: 1151-1162
- Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H, Kangasjärvi J** (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **39**: 59-69
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002) The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell Online* **14**: S153-S164
- Vahala J, Schlagnhauser CD, Pell EJ** (1998) Induction of an ACC synthase cDNA by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiologia Plantarum* **103**: 45-50
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gomez-Rodriguez MV, Chaki M, Pedrajas JER, Fernandez-Ocana A, DEL RIO LA, Barroso JB** (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, cell & environment* **29**: 1449-1459
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gomez-Rodriguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernandez-Ocana A, Del Rio LA, Barroso JB** (2006) The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell Environ* **29**: 1449-1459
- Valkama E, Koricheva J, Oksanen E** (2007) Effects of elevated O₃, alone and in combination with elevated CO₂, on tree leaf chemistry and insect herbivore performance: a meta-analysis. *Global Change Biology* **13**: 184-201
- Venables WN, Smith DM** (2009) An Introduction to R. Network Theory Ltd
- Vidal J, Chollet R** (1997) Regulatory phosphorylation of C4 PEP carboxylase. *Trends in Plant Science* **2**: 230-237
- Vingarzan R** (2004) A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment* **38**: 3431-3442
- Volz A, Kley D** (1988) Evaluation of the Montsouris series of ozone measurements made in the nineteenth century.
- Von Gunten U** (2007) The basics of oxidants in water treatment. Part B: ozone reactions.

- Wakao S, Andre C, Benning C** (2008) Functional analyses of cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenases and their contribution to seed oil accumulation in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **146**: 277-288
- Wakao S, Benning C** (2005) Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **41**: 243-256
- Wang P, Du Y, Li Y, Ren D, Song CP** (2010) Hydrogen Peroxide-Mediated Activation of MAP Kinase 6 Modulates Nitric Oxide Biosynthesis and Signal Transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **22**: 2981-2998
- Wang Q, Rowan MJ, Anwyl R** (2004) β -Amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. *The Journal of neuroscience* **24**: 6049-6056
- Wang Y, Liu T, Wu C, Li H** (2008) A strategy for direct identification of protein S-nitrosylation sites by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **19**: 1353-1360
- Wang YQ, Feechan A, Yun BW, Shafiei R, Hofmann A, Taylor P, Xue P, Yang FQ, Xie ZS, Pallas JA** (2009) S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 2131-2137
- Webb AAR, McAinsh MR, Taylor JE, Hetherington AM** (1996) Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Advances in Botanical Research* **22**: 45-96
- Wendt UK, Hauschild R, Lange C, Pietersma M, Wenderoth I, von Schaewen A** (1999) Evidence for functional convergence of redox regulation in G6PDH isoforms of cyanobacteria and higher plants. *Plant molecular biology* **40**: 487-494
- Wieser G, Matyssek R** (2007) Linking ozone uptake and defense towards a mechanistic risk assessment for forest trees. *New Phytol* **174**: 7-9
- Wieser G, Matyssek R, Kostner B, Oberhuber W** (2003) Quantifying ozone uptake at the canopy level of spruce, pine and larch trees at the alpine timberline: an approach based on sap flow measurement. *Environmental Pollution* **126**: 5-8
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562-565
- Wilkinson S, Davies WJ** (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment* **33**: 510-525
- Wilkinson S, Mills G, Illidge R, Davies WJ** (2012) How is ozone pollution reducing our food supply? *Journal of experimental botany* **63**: 527-536
- Wittig VE, Ainsworth EA, Long SP** (2007) To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. *Plant, cell & environment* **30**: 1150-1162
- Wittig VE, Ainsworth EA, Naidu SL, Karnosky DF, Long SP** (2009) Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. *Global Change Biology* **15**: 396-424
- Wohlgemuth H, Mittelstrass K, Kschieschan S, Bender J, Weigel HJ, Overmyer K, Kangasjärvi J, Sandermann H, Langebartels C** (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell & Environment* **25**: 717-726
- Xue Y, Liu Z, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X, Ren J** (2010) GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PloS one* **5**: e11290-e11290
- Yaeno T, Matsuda O, Iba K** (2004) Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *The Plant Journal* **40**: 931-941
- Yalpani N, Enyedi AJ, León J, Raskin I** (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* **193**: 372-376
- Yamasaki H, Cohen MF** (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends in plant science* **11**: 522-524
- Yang ES, Richter C, Chun JS, Huh TL, Kang SS, Park JW** (2002) Inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 927-937

- Yoshida S, Tamaoki M, Ioki M, Ogawa D, Sato Y, Aono M, Kubo A, Saji S, Saji H, Satoh S, Nakajima N** (2009) Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone-exposed *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **136**: 284-298
- Yun BW, Feechan A, Yin M, Saidi NBB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang JG, Kwon E, Spoel SH, others** (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*: 264-268
- Zago E, Morsa S, Dat JF, Alard P, Ferrarini A, Inze D, Delledonne M, Van Breusegem F** (2006) Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol* **141**: 404-411
- Zago E, Morsa S, Dat JF, Alard P, Ferrarini A, Inzé D, Delledonne M, Van Breusegem F** (2006) Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant physiology* **141**: 404-411
- Zarembinski TI, Theologis A** (1994) Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Molecular Biology* **26**: 1579-1597
- Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J** (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15811

Résumé:

L'ozone (O_3), polluant atmosphérique et gaz à effet de serre, est responsable des pertes de production pour plusieurs espèces végétales. Actuellement, les seuils de risques ne prennent pas en considération la capacité de détoxification intrinsèque des cellules, qui dépend en partie de la régénération du NADPH. Dans cette dernière perspective, l'étude des différentes NADP-déshydrogénases cytosoliques dans les feuilles de deux génotypes de peuplier euraméricain (*Populus deltoides* x *Populus nigra*), montre que les activités de la cG6PDH (glucose-6-phosphate déshydrogénase) et de la ME (enzyme malique) sont plus élevées chez le génotype tolérant *Carpaccio* en réponse à un traitement O_3 (120 ppb pendant 17 jours). Dans ces conditions, le maintien des teneurs en NADPH chez *Carpaccio*, nous a permis de conclure que la capacité des cellules à régénérer ce nucléotide, contribue à améliorer la tolérance face à l' O_3 . Par une approche de génétique inverse chez *Arabidopsis*, nous avons étudié l'importance de l'activité isocitrate déshydrogénase (ICDH) et de la glutathion réductase 1 (GR1) sous O_3 , dans un contexte de modulation de la durée du jour. Nous montrons ainsi pour les différents génotypes une plus grande sensibilité à l' O_3 lorsque les plantes croissent sous un régime de jours longs, nous soulignons l'interconnexion entre déshydrogénases NADP-dépendantes chez le mutant *icdh* et nous mettons en évidence un possible rôle du glutathion dans le contrôle des interactions entre les fonctions de signalisation oxydante et antioxydante chez le mutant *gr1*. Enfin, nous avons montré que le monoxyde d'azote (NO) pouvait être en partie impliqué dans la régulation post-traductionnelle de la PEPC sous O_3 . En effet, nous avons montré que le SNP (donneur de NO) mime les effets de l' O_3 alors que le prétraitement de *rcd1*, mutant surproducteur de NO sous O_3 , avec du cPTIO + L-NNA prévient partiellement ces effets. De plus, l'incubation *in vitro* d'extraits protéiques foliaires avec du GSNO stimule fortement l'activité PEPC. Tous ces résultats corroborent l'hypothèse que sous O_3 , l'activité PEPC pourrait être modulée *via* S-nitrosylation. Cette hypothèse est confortée par la prédiction dans la séquence d'acides aminés de la PEPC de trois cystéines S-nitrosylées, très conservées chez les plantes.

Abstract :

Ozone (O_3), both an air pollutant and a greenhouse gas, is responsible for yield production losses. Current flux based threshold indices do not take in consideration intrinsic cell capacity for detoxification, which partly depends on NADPH regeneration. In this optic, the study of the NADP-dehydrogenases within leaves of two hybrid poplar (*Populus deltoides* x *Populus nigra*) genotypes showed that the activation of cG6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) and of ME (malic enzyme) was higher in the tolerant genotype (*Carpaccio*) in response to O_3 treatment (120 ppb for 17 days). The maintenance of NADPH levels in *Carpaccio*, supported the hypothesis that the capacity for cells to regenerate this nucleotide, contributes to improve tolerance to O_3 . To investigate the importance of a specific cytosolic NADP-dehydrogenase, we used a reverse genetic approach to test isocitrate dehydrogenase (*icdh*) and glutathione reductase 1 (*gr1*) mutants to O_3 in a context of day-length modulation. Our study reveals an important role for day length conditions in influencing O_3 responses with extended damage for all the genotypes in long days, we pointed to overlapping functions of NADP-dependent dehydrogenases in *icdh* mutants, and highlights novel roles for the glutathione system in controlling the interactions between antioxidative and oxidative signalling functions in *gr1* mutant. Finally, we showed that nitric oxide (NO) could be partly implied in the post-translational regulation of PEPC under ozone. Treatment of the wild ecotype Col-0 with the NO donor SNP mimicked the O_3 effects concerning development of visible injuries and the stimulation of PEPC activity. The pre-treatment of the NO-overproducer mutant *rcd1*, with cPTIO+L-NNA partially prevented both of these O_3 effects. Additionally, *in vitro* incubation of a protein extract with GSNO strongly enhanced PEPC activity. All together, these results corroborated the hypothesis of the modulation of PEPC activity via S-nitrosylation under O_3 , which is reinforced by the presence of three predicted and highly preserved S-nitrosylated cysteines in the protein sequence.