



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la réponse de deux cultivars de *Vigna unguiculata* à une contrainte ozone combinée ou non à la sécheresse : Régulation de protéines membranaires (AOX, PTOX et pUCP)

Francisco Yuri Maia de Sousa

## ► To cite this version:

Francisco Yuri Maia de Sousa. Caractérisation de la réponse de deux cultivars de *Vigna unguiculata* à une contrainte ozone combinée ou non à la sécheresse : Régulation de protéines membranaires (AOX, PTOX et pUCP). Sylviculture, foresterie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0258 . tel-01749888

**HAL Id: tel-01749888**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749888>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



INRA



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Collegium Sciences et Technologies

Pôle Agronomie, Agroalimentaire, Forêt

École Doctorale : Sciences et Ingénierie Ressources, Procédés, Produits et Environnement

Département de Formation Doctorale : Biologie Forestière

## Thèse

présentée pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université de Lorraine  
en Biologie Végétale & Forestière  
par **Francisco Yuri MAIA DE SOUSA**

# **Caractérisation de la réponse de deux cultivars de *Vigna unguiculata* à une contrainte ozone combinée ou non à la sécheresse :**

Régulation de protéines membranaires (AOX, PTOX et pUCP)

Soutenue publiquement le 23 novembre 2012 à Fortaleza devant la commission d'examen :

P. Carol	Pr., UPMC	Rapporteur
I. G. Maia	Pr., UNESP	Rapporteur
P. Dizengremel	Pr., UL	Examineur
M. E. Farias de Aragão	Pr., UECE	Examinatrice
D. Fernandes de Melo	Pr., UFC	Examinatrice / Directrice de thèse
Y. Jolivet	Pr., UL	Examineur / Co-directeur de thèse
M. G. Silva Lima	Pr., UFC	Invitée

---

**Unité Mixte de Recherche 1137 INRA/UL Écologie & Écophysiologie Forestières**

Equipe physiologie de la diversité de la réponse aux contraintes  
Collegium Sciences et Techniques; BP 239 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy



## REMERCIEMENTS

---

Après une bonne dizaine d'années à travailler dans la recherche auprès du laboratoire de Bioénergétique de l'Université Fédérale du Ceará, ainsi que lors des deux dernières années passée à Nancy au sein du laboratoire de Écologie et Écophysiologie Forestières, mes remerciements vont à tous ceux, et ils sont nombreux, qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la rédaction de cette thèse comme étant le couronnement d'un parcours scientifique.

Tout d'abord je voudrais remercier ma Prof. Dirce, ma première et la plus importante source d'inspiration pour le travail de recherche, son infatigable talent de persévéré même lorsque les conditions ne sont pas les plus faciles, mon appris que même si le chemin est difficile on peut toujours profiter des longues heures de discussion afin de travailler plus heureux.

Dans le cadre de cette thèse je voudrais aussi beaucoup remercier mon Prof. Yves que m'a inconditionnellement accueillir au sein de son équipe, m'a aidé depuis mes premiers pas pour le moins hésitants dans le labo jusqu'aux derniers jours de rédaction, parce qu'il a toujours fait preuve de patience et de compréhension, ainsi que de confiance en mon travail. Merci aussi Yves pour toutes les heures très fructueuses de discussion autour de ce travail qu'on a tissé ensemble.

Je remercie le Prof. Pierre Dizengremel qui m'a accueilli dans son équipe et pour les discussion qui m'ont toujours aidé à voir les résultats d'une autre façon. Merci aussi à Marie-Paule Hasenfratz-Sauder pour le français appris. Un merci très spécial a Marie-Noëlle Vaultier pour toutes les astuces à la paillasse et celles du quotidien qui m'ont beaucoup aidé en temps qu'étranger en France.

Merci a tous ceux qui ont travaillé avec moi ou à mon côté au laboratoire brésilien, autant les membres du labo ainsi que tous les amis qui ont apparu tout au long de ce grand voyage : Luciana Maia, Alana Cecília, Neuza Felix et Erika Freitas. Grâce à l'aide de nombreuses personnes, j'ai réussi à terminé cette étape, ici je veux remercier aussi le Prof. Hélio Costa pour toutes les astuces et mon initiation à la bioinformatique. En ce qui concerne les collègues du labo, merci pour l'environnement de travail productif et convivial, parmi eux Camilla Freitas, João Henrique, Deborah Moura, Carine et Carol Almada et Edson Garantizado.

Mes remerciements vont bien sûr à toute l'équipe du cinquième. Tout d'abord : Joëlle pour ses précieux conseils de labo, son aide dans la microscopie et aussi son infatigable envie d'aider, Jean-Claude le râleur de haut niveau, Mireille, Dany, Elisabeth, Dominique avec qui travailler se révèle aussi enrichissant, Lysiane, et Prof. Daniel Epron enfin pour son soutien en temps que directeur du labo. Merci



aussi aux collègues du sixième Caroline, Pierrick et Sandrine pour les discussions pendant les déjeuners à la brasserie, toujours amusants et informatifs.

Un merci spécial à mon amie Morgane qui pendant mon séjour au labo a tout fait pour m'aider autant dans la recherche que dans la vie de tous les jours. Merci pour les discussions philosophiques, pour tout le soutien moral que tu m'as apporté, n'oubliant pas les plusieurs « sorties culturelles » aussi important que le travail au labo.

Je ne peux pas ne pas remercier les stagiaires qui ont contribué à ce travail de thèse : Clio qui n'a pas eu de bol avec le Western Blotting et Pierre qui en a eu un peu plus avec le MDA.

Je voudrais aussi remercier ma famille pour le soutien inconditionnel pendant toute ma vie et surtout pendant mon séjour en France, mon père, mes frères et ma mère, sans leurs soutiens, le travail deviendrait impossible et mon séjour en France presque inachevable.

Un dernier merci aux amis de longues dates du Brésil, Wal, Célio et Juliana, ainsi que les nouveaux acquis pendant mon séjour en France. Ces derniers, très importants dans la dernière ligne droite de tout ce travail. Merci Emmanuel Boutin pour l'énorme soutien apporté et à toute la troupe aussi : Romain, Manon A., Manon H., Cédric, Ségolène, Elodie, Julien et Anthony.





Le travail expérimental présenté dans ce mémoire de thèse a été réalisé dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université de Lorraine et l'Université Fédérale du Ceará et financé par l'accord CAPES/COFECUB 685/10. Le travail a été mené sous la co-responsabilité d'Yves Jolivet et de Marie-Noelle Vaultier de l'équipe Physiologie et Diversité de la réponse aux contraintes de l'UMR 1137 INRA/UL Écologie et Écophysiologie Forestières à Vandoeuvre-lès-Nancy, ainsi que sous la responsabilité de Dirce Fernandes de Melo du Laboratoire de Bioénergétique du Département de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'Université Fédérale du Ceará.

Financé par :





“Remembering that you are going to die is the best way I know  
to avoid the trap of thinking you have something to lose.  
You are already naked.  
There is no reason not to follow your heart.”

Steve Jobs



Les interactions entre chloroplastes et mitochondries restent encore mal connues, notamment en réponse à des conditions de stress. Dans ces conditions, il est suggéré que les voies de transfert d'électrons liées à des protéines découplantes AOX ou pUCP (mitochondriales) et PTOX (plastidiale) pourraient limiter la formation de ROS afin d'atténuer les dommages oxydatifs dans ces organites. Dans le cadre de notre travail, nous avons retenu deux cultivars de *Vigna unguiculata*, cv 1183 et cv EPACE. Les deux cultivars n'ont pas montré de réelles différences de sensibilité à la sécheresse. Par contre le cultivar EPACE s'est montré plus tolérant à l'O<sub>3</sub> sur la base du développement des nécroses et plusieurs paramètres physiologiques ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{PSII}$ ) et biochimiques (glutathion). Pour les profils d'expression des gènes codant pour l'AOX, la pUCP et la PTOX deux réponses ont été clairement identifiées chez le cultivar EPACE. Sur un court terme l'expression de ces protéines est généralement stimulée. Sur un plus long terme (14 jours), la réponse diffère en fonction de la contrainte. Sous O<sub>3</sub>, la plus forte expression des protéines mitochondriales est maintenue alors que le gène codant pour la PTOX est sous-régulé. Sous sécheresse seule la protéine plastidiale (PTOX) reste sur-régulée. Dans des conditions de combinaison de contrainte, la sécheresse a peu d'effet sur l'influx d'O<sub>3</sub> dans les feuilles, et les gènes *VuPTOX* et *VuUCP1b* sont sur-régulés après 3 et 7 jours de contrainte. Cette sur-régulation, déjà observée en réponse à la sécheresse seule, pourrait jouer un rôle déterminant pour prévenir la formation de ROS à la fois dans la mitochondrie et dans le chloroplaste.



Possible interactions between chloroplast and mitochondria remain poorly known, particularly in response to stress conditions. Under these conditions, it is suggested that the electron transfer pathways linked to AOX or pUCP (mitochondrial uncoupling proteins) and PTOX (plastidial uncoupling protein) could limit the formation of ROS to reduce oxidative damage in cellular organelles. In our work, we selected two cultivars of *Vigna unguiculata*, cv 1183 and cv EPACE. Under our experimental conditions, both cultivars showed no real differences in sensitivity to drought. However cv EPACE was more tolerant to O<sub>3</sub> based on the development of necrosis and several physiological parameters ( $F_v/F_m$ ,  $\phi_{PSII}$ ) and biochemical (glutathione content). For the expression profiles of genes encoding AOX, PUCP and PTOX two responses were clearly identified in the cultivar EPACE. On a short-term, expression of these proteins is generally stimulated. On a longer term (14 days), the answer differs depending on the treatment. Under O<sub>3</sub>, the strongest expression of mitochondrial proteins is maintained while the gene encoding the PTOX is down-regulated. Under drought only the plastid protein (PTOX) is up-regulated. Under conditions of stress combination, drought has little effect on the influx of O<sub>3</sub> in the leaves, and the *VuPTOX* and *VuUCP1b* genes are up-regulated after 3 and 7 days of stress. This over-regulation, already observed in response to drought alone could play a role in preventing the formation of ROS in both mitochondria and chloroplasts.





ADN – Acide Désoxyribonucléique

ADNc – Séquences d'ADN complémentaire des ARN messagers

AOX – Oxidase Alternative

ARN – Acide Ribonucléique

ARNm – ARN messenger

EST – *Expressed Sequence Tag* (marqueur de séquence transcrite)

$F_v/F_m$  – Rendement quantique maximal du photosystème II

O<sub>3</sub> – Ozone

ppb – Partie par milliard, en volume

ppm – Partie par million, en volume

PSI, II – Photosystèmes I et II

PTOX – Oxidase terminale des plates

pUCP – Protéine Découplante des plantes

qN – *Quenching* non-photochimique

ROS – *Reactive Oxygen Species* (espèces oxygénées réactives)

RWC – Teneur relative en eau

SFW – Masse fraîche de la partie aérienne

$\phi_{PSII}$  – Rendement quantique du photosystème II



## TABLE DE MATIERES

---

1. Justificatif et sujet de travail	12
2. État de l'art	17
2.1 Le Niébé	17
2.2 Les contraintes abiotiques	20
2.2.1 La sécheresse	22
2.2.2 L'ozone	24
2.3 La détoxification	27
2.4 Le métabolisme énergétique	29
2.4.1 La mitochondrie	29
2.4.1.1 L'oxidase alternative (AOX)	30
2.4.1.2 La protéine découplante des plantes (pUCP)	33
2.4.2 Les plastes et les chloroplastes	35
2.4.2.1 La chlororespiration	37
2.4.2.2 L'oxydase plastidiale (PTOX)	40
3. L'approche expérimentale	44
3.1 Matériel végétal et conditions de culture	44
3.1.1 Le dispositif de fumigation	45
3.1.2 Procédure de fumigation	46
3.1.3 Les indices d'exposition à l'ozone	46
3.2 Mesures de la fluorescence chlorophyllienne	47
3.3 Extraction de l'ARN total et RT-PCR en temps réel	49
3.4 Extraction des protéines totales foliaires	50
3.5 Western blotting	51
4. Les réponses physiologiques de deux cultivars de <i>Vigna unguiculata</i> à la sécheresse combinée à l'exposition à l'ozone	54
Introduction	57
Material and Methods	60
Results	65
Discussion	70
5. Participation de protéines découplantes mitochondriales (AOX et pUCP) et de l'oxydase terminale plastidiale (PTOX) dans la réponse de <i>Vigna unguiculata</i> à la sécheresse combinée à l'exposition à l'ozone	76
Introduction	80
Material an Methods	83
Results	89
Discussion	93
6. Analyse de l'expression de l'AOX (Résultats préliminaires)	99
7. Conclusion et perspectives	102
8. Références Bibliographiques	110



## Article soumis

Maia, Y., Bagard, M., Costa, J.H., Vaultier, M-N., Rebouças, D.M., Grandjean, P., Dizengremel, P., Repellin, A., Fernandes de Melo D. and Jolivet, Y.

**Involvement of plastid terminal oxidase (PTOX) and mitochondrial uncoupling proteins (AOX and pUCP) in the response of *Vigna unguiculata* to combined drought stress and ozone exposure**

Soumis à Plant, Cell & Environment

## Article en préparation

Maia, Y., Bagard, M., Costa, J.H., Vaultier, M-N., Rebouças, D.M., Grandjean, P., Dizengremel, P., Repellin, A., Jolivet, Y. and Fernandes de Melo D.

**Physiological responses of two *Vigna unguiculata* cultivars to combined drought stress and ozone exposure**



# JUSTIFICATIF & SUJET DE TRAVAIL





## 1- JUSTIFICATIF ET SUJET DE TRAVAIL

Les activités anthropiques sont responsables depuis plus d'un siècle d'un changement climatique qui s'accompagne d'une augmentation de la concentration des gaz à effet serre (CO<sub>2</sub>, ozone) et par conséquent d'une augmentation de la température ainsi que des périodes de sécheresse prolongée, d'inondations et de salinité des sols. Ces diverses contraintes environnementales, et en particulier la sécheresse et/ou l'exposition à des doses élevées d'ozone ont un impact significativement défavorable sur la productivité des plantes cultivées (Morgan, Ainsworth, & Long, 2003; Smith & Griffiths, 1993). Dans ce contexte, la région du Nord-Est du Brésil est particulièrement touchée, car elle est déjà sujette à des sécheresses périodiques. A ces conditions défavorables engendrées par la sécheresse, il faut aussi ajouter des concentrations élevées d'ozone dans la troposphère, qui est aujourd'hui reconnu comme un polluant atmosphérique majeur. Bien que la situation dans les régions tropicales à l'égard de ce polluant soit moins critique que dans les zones tempérées, des épisodes de pollution par l'ozone ont été identifiés au Brésil, en particulier dans la périphérie des grandes métropoles (Morgan et al., 2003; Morgan, Mies, Bollero, Nelson, & Long, 2005).

Pour prévenir ces risques, les recherches ciblées sur les effets des stress environnementaux connaissent un regain d'intérêt en particulier à des échelles cellulaire et moléculaire. L'objectif de ces recherches est de décrypter les processus mis en place par les plantes pour améliorer leur tolérance aux contraintes abiotiques et biotiques en précisant les mécanismes moléculaires sous-jacents. Après deux décennies, le développement des techniques de biologie moléculaire ont permis de réexaminer la question principalement à travers l'identification de gènes candidats utilisés comme marqueurs pour la sélection assistée à l'aide de la transformation



génétique des plantes. Parmi les plantes cultivées, le niébé *Vigna unguiculata* (L.) Walp est une légumineuse vivrière importante dans le nord-est du Brésil, représentant la principale source d'approvisionnement alimentaire pour des nombreuses familles et aussi une importante source de gain économique (Araújo & Watt, 1988).

Pour appréhender la façon par lequel le métabolisme énergétique représente un mécanisme d'adaptation des plantes à une contrainte environnementale, nous proposons d'explorer les mécanismes moléculaires et biochimiques de régulation de trois protéines membranaires: l'Alternative Oxydase (AOX) présente dans la membrane interne des mitochondries, la protéine découplante mitochondriale de plante (pUCP) et l'oxydase plastidiale (PTOX). Ces protéines ont un rôle dans le transfert des électrons lié à la chaîne respiratoire ou au cycle photochimique et peuvent ainsi contrôler la production des ROS dans la cellule. Dans des conditions de sécheresse et/ou d'ozone, susceptibles de modifier la charge cellulaire en ROS, la régulation de ces protéines est d'un grand intérêt. Des travaux préalables, menés en collaboration entre l'équipe du Laboratoire de Bioénergétique (Université Fédérale du Ceará) et l'UMR 1137 (Equipe PhysioDiv), ont déjà porté sur l'engagement de l'AOX dans des cultivars de *Vigna unguiculata* présentant des niveaux de sensibilité différents par rapport à la salinité/sècheresse (Fernandes de Melo et al., 1994). Ces travaux ont également permis de préciser les mécanismes de régulation de l'AOX (Lima-Júnior et al., 2000). La collaboration entre les deux équipes de recherche a été récemment renforcée par le développement d'un projet CAPES/COFECUB 685/10 intitulé « Approches biochimiques et moléculaires pour la compréhension des mécanismes d'adaptation des plantes à des stress abiotiques » qui associe également l'UMR BioEMCo, équipe Ibios, de l'Université Paris Est Créteil. Outre les aspects d'étude moléculaire et biochimique sur les protéines découplantes mitochondriale et chloroplastique, le projet a pour objectif d'étudier



la composition lipidique des membranes des cellules foliaires, dont certains d'entre eux, sont connus comme spécifiques d'un des organites cellulaires ainsi que l'expression de gènes codant pour leur dégradation et pour la détoxification cellulaire. Le matériel d'étude retenu pour ce projet est *Vigna unguiculata*, avec l'objectif de travailler sur des cultivars qui présentent des différences de tolérance aux contraintes sécheresse et/ou ozone.

- Mon travail de thèse a donc été orienté en premier sur la caractérisation physiologique de deux cultivars de *Vigna unguiculata* EPACE et 1183, connus pour présenter des différences de sensibilité à la sécheresse (travaux de Torres-Franklin et al., (2007)) mais pour lesquels aucune indication n'existait sur leur tolérance à l'ozone et à la combinaison des deux contraintes.
- Dans ce manuscrit, après une première partie qui présentera l'approche expérimentale utilisée dans mes travaux, il y a un premier chapitre de ma thèse (publication en cours de rédaction) que présentera des paramètres physiologiques et biochimiques mesurés dans les feuilles des deux cultivars et qui permettent de caractériser d'éventuelles différences de sensibilité aux contraintes étudiées (ozone, sécheresse et la combinaison de deux contraintes).
- le deuxième chapitre est un manuscrit consacré à la régulation des enzymes découplantes des plastes (PTOX) et de la mitochondrie (AOX et pUCP) dans les feuilles de *Vigna unguiculata*, cultivar EPACE, face aux contraintes appliquées. Pour chacune de ces conditions de contrainte, un suivi des niveaux de transcrits (utilisation de la PCR en temps réelle), et d'activité dans les feuilles (fluorescence de la chlorophylle), a été effectués.

Ces travaux constituent donc une contribution importante permettant de mieux cerner les mécanismes moléculaires, biochimiques et physiologiques qui



permettraient l'identification de variétés plus tolérantes aux stress environnementaux, et en particulier à la sécheresse, l'ozone et à la combinaison des deux contraintes.





# ÉTAT DE L'ART

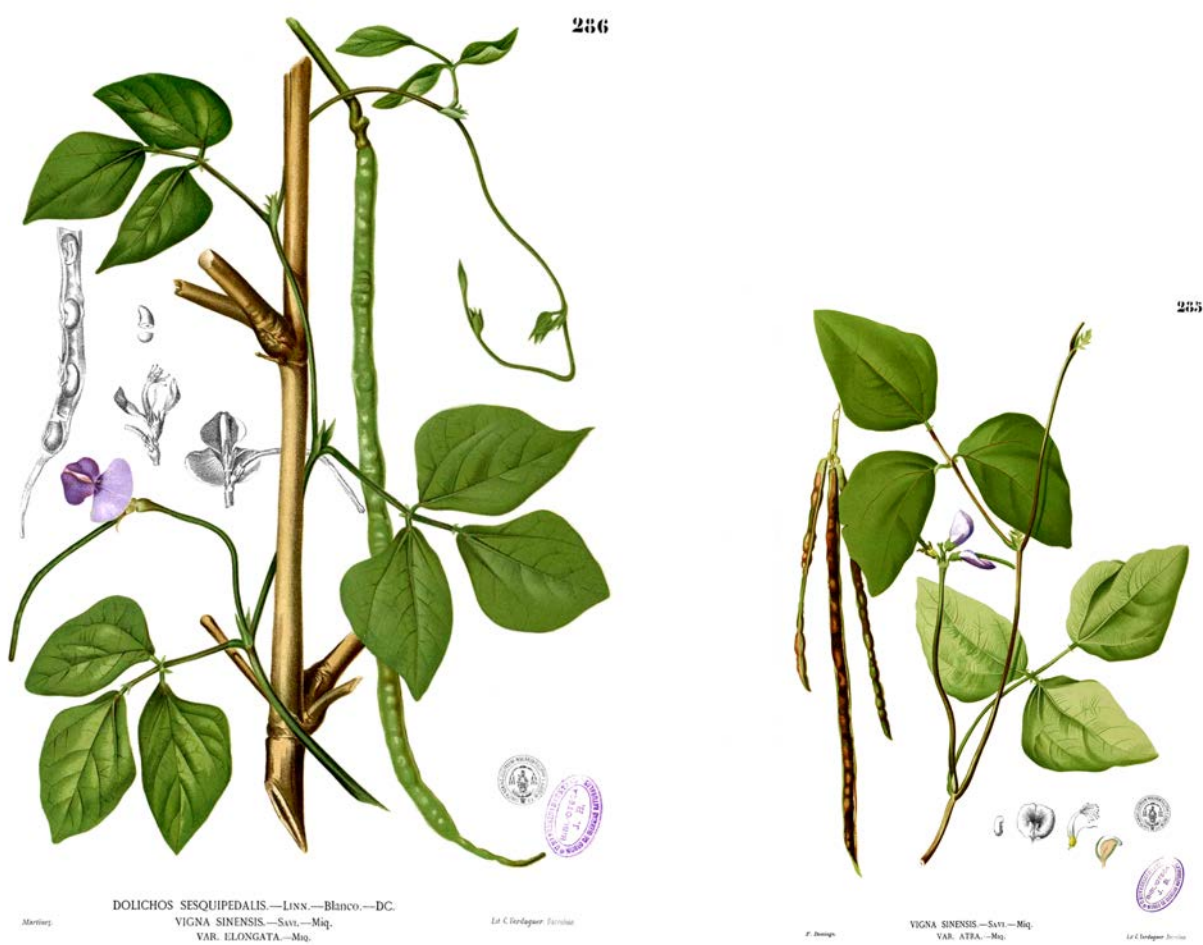


Figure 1. Planches Botaniques représentant *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Fabacées), antérieurement appelée *Vigna sinensis*.

## 2- ETAT DE L'ART

### 2.1- Le Niébé

L'espèce *Vigna unguiculata* (L.) Walp est vulgairement connue sous le nom de niébé. C'est une eudicotylédone qui appartient à l'ordre des Fabales, famille des Fabacées, anciennement appelées Légumineuses. Le genre *Vigna* est constitué de plus de 200 espèces. Il est originaire des régions chaudes et présent sur tous les continents (Fery, 2002). L'emplacement précis du centre d'origine du niébé est très difficile à déterminer. Sur la base de la variation morphologique et génétique, en ce qui concerne le nombre et la répartition géographique des variétés sauvages ainsi que leurs caractéristiques primitives, il est accepté que les espèces les plus primitives de *Vigna unguiculata* (L.) Walp sauvages sont apparues dans le sud de l'Afrique. Le Niébé migra dans d'autres parties de l'Afrique, de l'Europe et de l'Inde et fut importé en Amérique tropicale autour de l'an 1700 par les Espagnols avec la traite des esclaves (Singh & Tarawali, 1997).

Les légumineuses contiennent des quantités relativement importantes de protéines, vitamines et minéraux et sont une source principale de protéines pour de nombreux individus dans le monde, pour des raisons culturelles et économiques. Sa composition chimique varie avec le cultivar, la terre et les conditions climatiques de la région (Iqbal, Khalil, Ateeq, & Sayyar Khan, 2006). L'espèce *Vigna unguiculata* (L.) Walp est une excellente source de protéines (23-25% en moyenne), contenant tous les acides aminés essentiels, des hydrates de carbone (62%), des vitamines, des minéraux, des fibres alimentaires, ainsi qu'une faible quantité de lipides et l'absence de cholestérol. De ce fait, le niébé est un aliment de base pour les populations à faible revenu dans le Nord-Est du Brésil (Andrade-Júnior et al., 2002). Le niébé est



Figure 2. Photographie de plantes de *Vigna unguiculata* en champs.

aussi essentiel pour soutenir la production de bétail et de céréales dans les régions semi-arides, servant de fourrage, de protection contre l'érosion et l'élimination de certaines plantes parasites. Une autre caractéristique importante de cette espèce est de promouvoir la fixation d'azote par des bactéries symbiotiques (*Bradyrhizobium* sp.). Ainsi, la production de niébé se montre capable de maintenir les réserves d'azote dans le sol et même de l'augmenter (Singh & Tarawali, 1997).

La superficie plantée en niébé dans le monde est d'environ 12,5 millions d'hectares, avec 8 millions (64% du total mondial) en Afrique occidentale et centrale. Les autres parties du monde, où le niébé est fortement présent, sont situées en Amérique du Sud, en Amérique centrale et en Asie, avec des zones également dans le sud-ouest de l'Europe, le sud-ouest des États-Unis et en Océanie. Parmi tous les pays, les principaux producteurs sont le Nigeria, le Niger et le Brésil (Quin, 1997). Au Brésil, le niébé est cultivé principalement dans la région Nord-Est semi-aride et dans de petites zones de l'Amazonie. Les principaux producteurs de niébé sont les États du Ceará (159.471 t), Piauí (58.786 t), Bahia (50.249 t) et du Maranhão (35.213 t), qui ont aussi les plus grandes superficies cultivées (IBGE, 2001).

En dépit d'être considérée comme une culture tolérante à la sécheresse, les recherches ont montré que l'apparition d'un déficit hydrique pendant la culture du niébé, en particulier dans les périodes de floraison et de remplissage des graines, peut entraîner une diminution marquée du rendement. Le stress hydrique réduit aussi le poids des nodules, de l'azote cumulé, de la production d'azote et de la production de matière sèche des plantes de niébé, surtout lorsque le stress hydrique est imposé entre la deuxième et cinquième semaine après le semis (Stanford, Santos, Silva, Santos, & Monteiro, 1990). Dans une étude basée sur l'efflux des solutés à partir de disques foliaires traités par le PEG *Vigna unguiculata* s'est révélée plus tolérante que d'autres espèces de haricot (Vasquez-Tello, Zuily-Fodil,



Pham-Thi, & Vieira da Silva, 1990). Toujours sur ce critère El Maarouf et al. (1999) ont caractérisé cv. EPACE comme étant un cultivar plus tolérant que cv. 1183 au stress hydrique (PEG). Vis-à-vis de l'ozone, les réponses du niébé ne sont pas connues. Quelques travaux sur *Glycine max*, une espèce assez proche de *Vigna unguiculata*, ont montré la sensibilité de cette fabacée à l'ozone par rapport à d'autres cultures (Mills et al., 2011; Mills, Buse, Gimeno, Bermejo, & Holland, 2007).

Les ressources moléculaires, génétiques et génomiques ont été développés pour le niébé avec un objectif de renforcer les programmes de sélection pour l'amélioration des variétés de niébé pour les États-Unis, l'Inde, le Brésil et de nombreux pays d'Afrique et d'Asie (Pottorff et al., 2012). Néanmoins, jusqu'à présent peu d'attention a été accordée à la caractérisation génétique et au développement des ressources génétiques pour le niébé. Actuellement, moins de 1000 EST de niébé ont été déposées dans les bases de données publiques et la plupart des séquences d'ADN génomique disponibles sont directement liées, soit à des ARNm codantes et régions entretoises, soit à des séquences anonymes exploités pour la RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction). La taille de son génome, de seulement 620 Mb, est l'un des plus petits parmi les plantes ce qui le positionne à l'extrémité (tailles les moins importantes) des génomes des végétaux (Paterson, 2006; Timko et al., 2008).

Parmi les principaux objectifs de liés a la sélection du niébé, ainsi qu'aux programmes d'amélioration de celui-ci, on peut noter la superposition des caractères agronomiques souhaitables tels que la tolérance aux stress abiotiques (sécheresse, salinité, chaleur et depuis peu polluants atmosphériques), le type de croissance des plantes et la qualité des semences ainsi que leurs résistance à de nombreuses infections bactériennes, aux maladies fongiques et virales, aux insectes, aux invertébrés (nématodes) et aux ravageurs herbivores. L'utilisation de sélection assistée par des marqueurs et d'autres moyens de sélection moléculaire pour le suivi





de traits monogéniques devrait dans un avenir proche accroître l'efficacité des programmes d'amélioration du niébé ainsi que fournir de nouvelles opportunités pour le développement du niébé comme un aliment de base et une ressource économique.

## **2.2- Les contraintes abiotiques**

Lorsque les plantes sont soumises à des conditions qui modifient son homéostasie cellulaire, elles sont considérées comme étant en situation de stress. Le stress de la plante peut affecter la croissance et la survie des plantes, ainsi que les rendements de culture. Les recherches pour comprendre comment la chaleur, la sécheresse, les inondations, le manque de nutriments, les herbicides, les pesticides, les produits chimiques, la pollution atmosphérique, le pH, les maladies, les herbivores, les métaux lourds et le niveau de lumière affectent la croissance et le développement de la plante, ont été très importantes ces dernières décennies (Baker & Rosenquist, 2004; Maxwell & Johnson, 2000). Pour faire face à cela et aux autres défis tels que la croissance démographique ainsi que la sécurité alimentaire et la compétition pour les ressources, il existe un réel besoin d'une nouvelle «révolution agricole» pour approvisionner la population mondiale, qui devrait augmenter de 7 à 10 milliards (dans les deux prochaines décennies), avec une augmentation nécessaire de la production alimentaire de 50-70% (Reynolds & Ortiz, 2010).

Les plantes ont évolué pour vivre dans des environnements où elles sont souvent exposées à une combinaison de contraintes. Étant sessiles, elles ont développées des mécanismes spécifiques qui leur permettent de détecter des changements environnementaux précis et de répondre à des conditions de

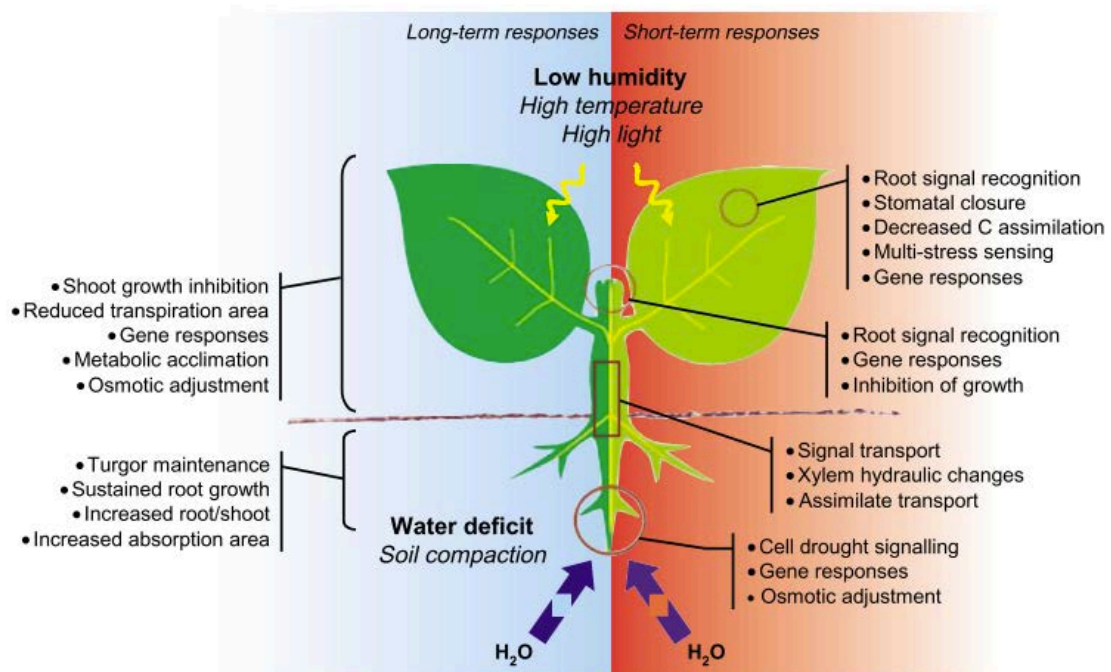


Figure 3. Mécanismes de réponse des plants à la sécheresse.

Gauche, réponses de long terme ou acclimatation ; droite, réponses de court terme.

D'après Chaves, Maroco, & Pereira (2003)

contraintes complexes, en essayant de minimiser le dommage. Ainsi, elles peuvent épargner des ressources importantes pour leur croissance et leur reproduction (Atkinson & Urwin, 2012). L'une des caractéristiques les plus importantes de cellules végétales est leur capacité de répondre aux fluctuations de leur environnement. Comprendre les liens entre les réponses initiales de la plante et les événements suivants qui constituent le succès de leurs ajustements à son environnement modifié est un des grands défis de la biologie végétale. La plupart des plantes cultivées poussent dans des conditions sous optimales, ce qui empêche les plantes d'atteindre leur plein potentiel génétique pour la croissance et la reproduction (Rockström & Falkenmark, 2000).

De toute façon, la baisse de la production agricole des différentes cultures peut être associée à l'effet de stress abiotiques qui vont avoir pour conséquence majeure la limitation de la fixation du CO<sub>2</sub> consécutive à une fermeture des stomates. Cette fermeture, soit à cause de la sécheresse, soit à cause de polluants atmosphériques, favorise des dommages induits par un excès de lumière (situation de stress photooxydant lié à un déséquilibre entre les réactions photochimiques et biochimiques, ces dernières étant restreintes du fait de la diminution de l'entrée du CO<sub>2</sub>). Ainsi, les plantes ont développé de nombreux mécanismes photoprotecteurs tels que des molécules et des enzymes antioxydants (Niyogi, 2000). Le stress oxydatif à partir de sources environnementales et des transitions développementales, telle que la maturation des graines, entraîne la formation des espèces réactives d'oxygène (ROS) dans les cellules végétales (Greene, 2002).

D'un autre côté, la pollution par l'ozone, qui conduit rapidement à l'augmentation de la charge oxydative cellulaire, est toujours comparé aux effets toxiques d'autres facteurs stressants comme la sécheresse, la salinité et la lumière. En général, les stress environnementaux promeuvent la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) tels que l'oxygène singlet, l'ion superoxyde (O<sup>2-</sup>), le

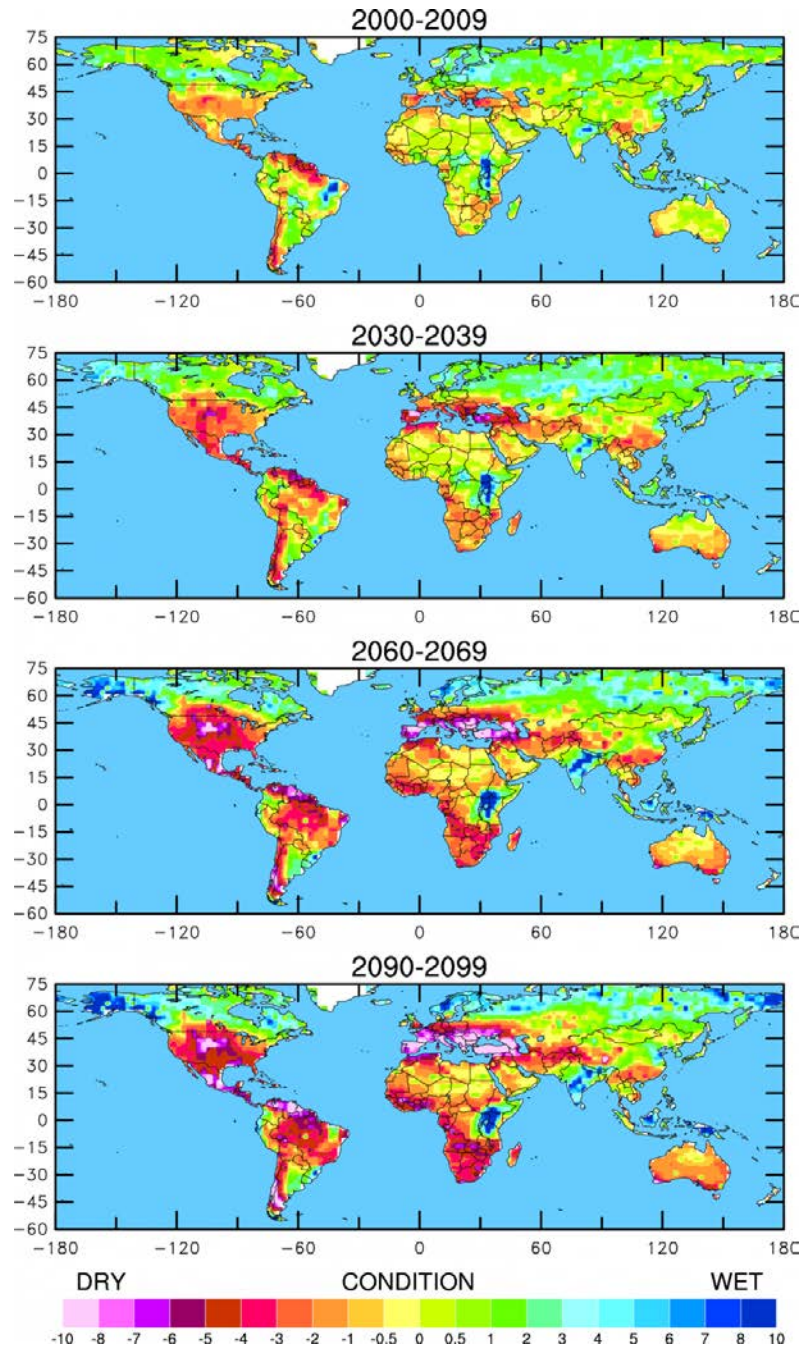


Figure 4. Cartes prévisionnelles montrant l'évolution de la sécheresse mondiale pour les cent prochaines années.

Ces quatre cartes illustrent le potentiel de la sécheresse actuelle et à venir dans le monde entier au cours des décennies indiquées, sur la base des projections actuelles concernant les futures émissions de gaz à effet de serre. Les cartes utilisent l'indice Palmer de gravité de sécheresse, qui affecte des nombres positifs lorsque les conditions sont exceptionnellement humides pour une région donnée, et des nombres négatifs lorsque les conditions sont exceptionnellement sèches.

D'après Dai (2010)

radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) mais également le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ces radicaux sont habituellement générés en continu, majoritairement en tant que sous-produits de la photosynthèse par transfert d'énergie ou d'électrons sur des composants associés au PSI ou au PSII, ainsi que par les réactions liées à la respiration par également des fuites d'électrons au niveau de plusieurs complexes de la chaîne respiratoire (Mittler, 2002). Grâce à la présence de nombreux systèmes antioxydants, la cellule est capable en situation d'homéostasie cellulaire de contenir cette charge oxydante. Les conditions stressantes, en fragilisant ces structures membranaires viennent exacerber cette production de ROS que la cellule peut ou non contenir en ajustant sa capacité antioxydante. L'incapacité à contenir cette charge oxydative conduit les ROS à réagir avec la majorité des macromolécules telles que l'ADN, les lipides et les protéines en causant des dommages cellulaires (Asada, 1999)(Li, Vallabhaneni, Yu, Rocheford, & Wurtzel, 2008). La contrainte oxydative est donc au « cœur » de nombreuses contraintes abiotiques.

### **2.2.1- La Sècheresse**

La sécheresse est un phénomène météorologique « qui définit le manque d'eau dans un sol » caractérisé par la rareté de l'eau. C'est l'un des facteurs les plus importants de l'environnement pour limiter la croissance et le développement des plantes, et par conséquent sa production. L'intérêt pour comprendre la résistance à la sécheresse, dans ses aspects fondamentaux ou appliqués, a récemment augmenté. Les préoccupations concernant les changements climatiques et la pénurie d'eau dans l'agriculture sont des raisons importantes pour l'expansion de ce domaine de recherche. L'augmentation de la demande mondiale de produits alimentaires alors que les ressources en eau pour l'agriculture diminuent impose que



la productivité des terres arides soit augmentée (Blum, 2011).

Très rapidement, la sécheresse édaphique conduit à la juxtaposition de contraintes tel qu'un fort déficit de pression de vapeur d'eau souvent associé à des températures élevées, une forte luminosité (rayonnement photosynthétiquement actif), une diminution de la disponibilité des nutriments du sol et de l'impédance mécanique de la croissance des racines dans un sol endurci (Wilkinson & Davies, 2010). Nonobstant, certaines espèces peuvent tolérer ou éviter la sécheresse. Les mécanismes comprennent: (1) la fermeture des stomates, (2) la diminution de la vitesse de croissance des feuilles et des tiges, (3) le contrôle de la vitesse d'extension des racines (Munns & Sharp, 1993) et/ou (4) l'augmentation de la conductance hydraulique des racines et des tiges (Hose, Steudle, & Hartung, 2000; Parent et al., 2009; Wilkinson & Davies, 2010). Ces processus physico-chimiques nécessitent la mise en place de toute une série de mécanismes moléculaires et cellulaires sous le contrôle de multiples signaux (Abdeen, Schnell, & Miki, 2010; Bohnert & Jensen, 1996). La survie en conditions de stress dépend donc de la capacité des plantes à percevoir le stimulus, de générer et de transmettre les signaux et aussi de promouvoir divers changements physiologiques et chimiques (Jiang & Zhang, 2002; Urao, Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2000). Pour répondre au stress causé par la sécheresse, les plantes ont développé la capacité à rapidement percevoir le stress en déclenchant l'accumulation d'un grand nombre d'ARNm synthétisés de novo et de polypeptides (Ingram & Bartels, 1996; Urao et al., 1999, 2000). La réorganisation rapide du génome dans des situations de stress environnementaux a été clairement documentée et l'expression de nombreux gènes en réponse à la sécheresse a également été décrite (Caruso et al., 2008).

Parmi les espèces cultivées, le niébé montre une grande diversité, au niveau de la morphologie de la plante, la maturité des graines, en étant aussi adapté à une large gamme d'environnements. De fait, le niébé peut servir de légumineuse

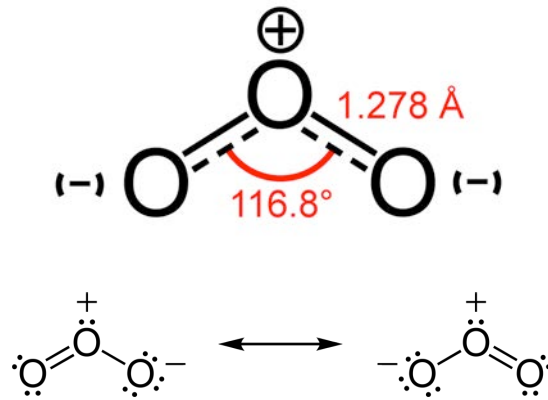


Figure 5. Représentation schématique de la molécule d'ozone ( $O_3$ ) et ses dipôles possibles.

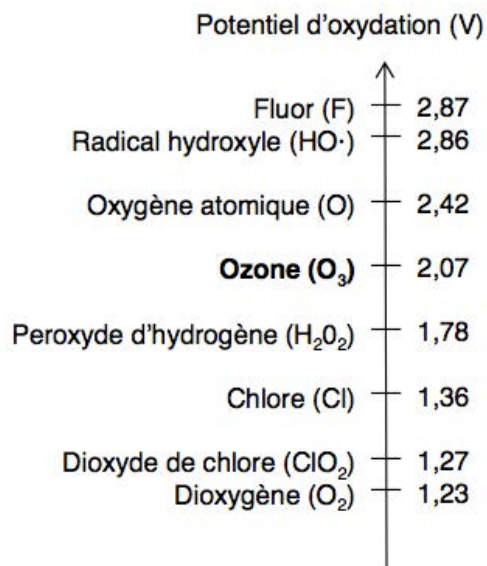


Figure 6. Potentiels d'oxydation de divers composés oxydants



modèle. Le niébé présente différentes adaptations à la sécheresse. Parmi les mécanismes fréquemment rencontrés pour cette espèce, il y a l'évitement avec la diminution de la surface foliaire et l'évitement de la déshydratation à travers d'un stage végétatif de tolérance à la sécheresse par retardement de la sénescence des feuilles (Hall, 2004). Les plants de niébé ont montré l'échappement à la déshydratation par le maintien d'un haut potentiel hydrique foliaire sans ajustement osmotique. Cela a été montré comme étant un modèle de réponse commune à la sécheresse des processus photosynthétiques par rapport à la teneur en eau du sol ou les changements de la conductance stomatique indépendamment du potentiel osmotique foliaire (Singh & Raja Reddy, 2011).

La régulation stomatique joue un rôle clé dans les échanges gazeux entre la végétation et l'interface atmosphérique. Quatre-vingt dix pour cent des pertes d'eau des plantes sont dues à la transpiration à travers des ouvertures stomatiques. Cependant, la limitation de la conductance stomatique serait reconnue comme le principal facteur de réduction de la photosynthèse lorsque l'eau devient indisponible. Elle est responsable de la plus faible disponibilité en CO<sub>2</sub> dans le chloroplaste à laquelle s'ajoutent des limitations non liées à la conductance stomatique telles que, la diminution de l'activité RuBisCo ainsi que l'efficacité photochimique du PSII qui surviennent progressivement en fonction de l'intensité et la durée du stress hydrique (Xu, Zhou, & Shimizu, 2010).

### **2.2.2- L'Ozone**

L'ozone est un constituant minoritaire de l'atmosphère terrestre, représentant de 0 à 0,07 ppm (parties par millions en volume) selon l'altitude. Contrairement à la teneur de la plupart des constituants atmosphériques tels que le dioxygène ou

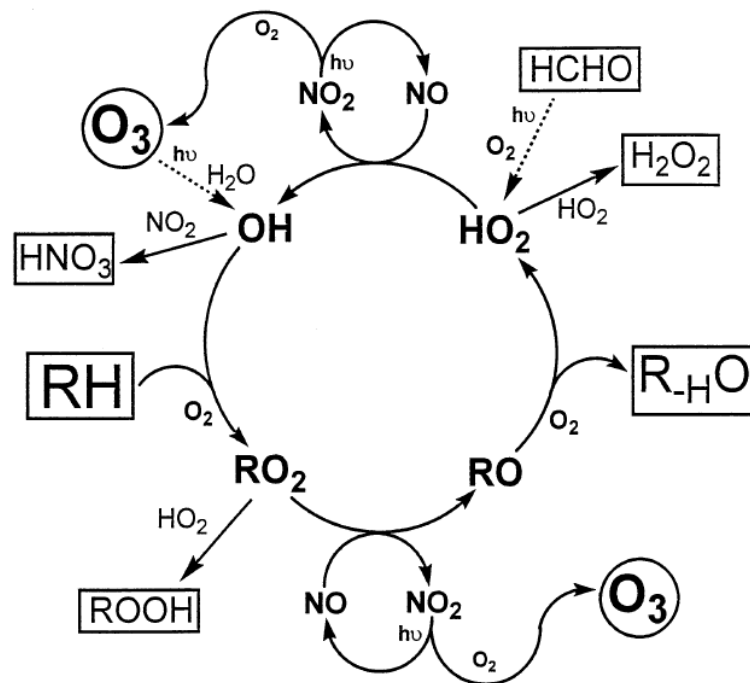


Figure 7. Cycle de l'ozone troposphérique.

*D'après Jenkin & Clemitshaw (2000)*

l'azote, la teneur atmosphérique en ozone ne décroît pas de façon régulière avec l'altitude mais est maximale au niveau de la stratosphère, dans les couches situées entre 20 et 30 km d'altitude. Cette fraction stratosphérique, qui concentre 90 % de l'ozone atmosphérique, est communément appelée la *couche d'ozone*. Les radiations solaires créent cette couche d'ozone dans la stratosphère qui absorbe une fraction très énergétique de ce rayonnement (UV-B). Ce processus à la fois réchauffe l'atmosphère et protège l'activité biologique sur la surface de la Terre des radiations nocives. Au cours des 50 dernières années, les mécanismes chimiques qui sont le siège de la couche d'ozone stratosphériques ont été établis, notamment les réactions catalytiques impliquant des espèces chimiques telles que: OH, HO<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, Cl et ClO (Rowland, 2006).

La troposphère, constituée des couches basses de l'atmosphère terrestre, s'étend de la surface du sol jusqu'à la tropopause, qui marque la limite à partir de laquelle la température cesse de diminuer avec l'altitude. L'épaisseur de la troposphère varie entre 13 et 16 km à l'équateur, et entre 7 et 8 km aux pôles. La troposphère, siège des phénomènes météorologiques et des flux atmosphériques, concentre la majeure partie de la masse d'air totale ainsi que la quasi-totalité de la vapeur d'eau, mais ne contient que 10 % de l'ozone atmosphérique. Les échanges verticaux entre stratosphère et troposphère contribuent de manière marginale à l'apport d'ozone dans la troposphère, dont la source principale est sa formation via une série de réactions photochimiques (Jenkin & Clemitshaw, 2000). Dans la troposphère, l'ozone agit comme gaz à effet de serre auquel s'ajoute un effet néfaste sur les écosystèmes terrestres. Le niveau global d'ozone a augmenté progressivement au cours du dernier siècle en raison de l'augmentation des émissions de précurseurs photochimiques d'origine anthropique (Bagard et al., 2008; Dizengremel, Le Thiec, Bagard, & Jolivet, 2008; Simmonds, Derwent, Manning, & Spain, 2004).

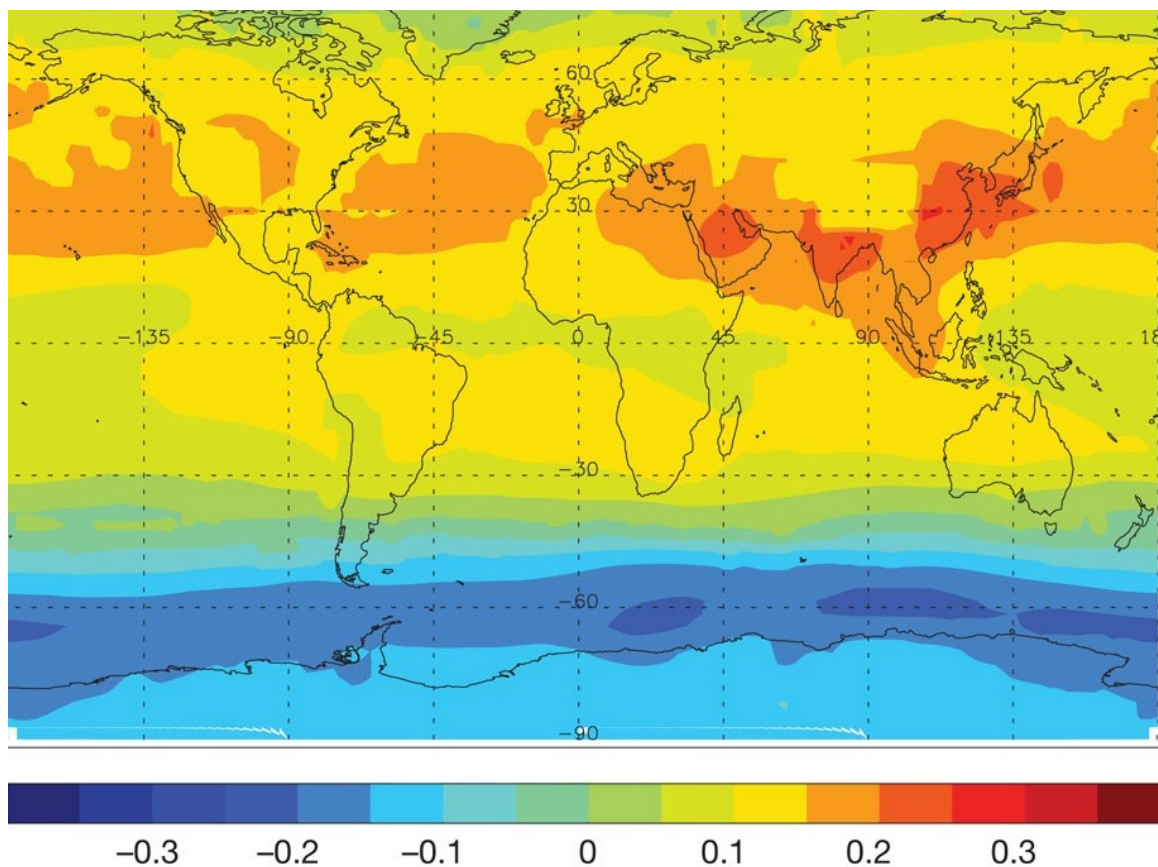


Figure 8. Carte présentant la variation moyenne annuelle (1970–2009) des concentrations d’ozone troposphérique en ppbv par an.

*D’après Allen, Sherwood, Norris, & Zender (2012)*

En faisant abstraction de l'intervention des composés issus des activités humaines, l'ozone peut se former dans la troposphère de la même manière que dans la stratosphère, à partir de la dissociation de molécules de dioxygène sous l'effet de rayons UV. Cette réaction est limitée par l'intensité relativement faible du rayonnement UV au niveau de la troposphère et l'ozone produit reforme assez vite du dioxygène. Seule l'intervention de composés organiques volatils émis par la végétation terrestre peut favoriser une accumulation *naturelle* limitée d'ozone (Lee & Wang, 2006). Le développement de l'industrie et des transports a considérablement modifié le cycle de l'ozone troposphérique. Les activités humaines produisent une grande quantité d'oxydes d'azote (Lee et al., 1997) qui, sous l'effet du rayonnement UV, peuvent libérer de l'oxygène. Les atomes d'oxygène se combinent au dioxygène de l'air pour former de l'ozone qui réagit avec le monoxyde d'azote, ce qui limite son accumulation. En théorie, la teneur en ozone dans la troposphère devrait résulter d'un équilibre photochimique déterminé par le rapport entre NO et NO<sub>2</sub> et l'intensité du rayonnement solaire, mais les teneurs mesurées dans la troposphère dépassent les valeurs prédites par ce modèle simple. En atmosphère polluée, de nombreux composés interviennent dans le cycle de formation de l'ozone troposphérique (Jenkin & Clemitshaw, 2000). Ces composés sont principalement des hydrocarbures en phase gazeuse, regroupés sous le terme de composés organiques volatils (COV). En se combinant préférentiellement avec le monoxyde d'azote, ces composés rendent possible l'accumulation de l'ozone. De plus, ils représentent une source de NO non issu de la dégradation de l'ozone, ce qui déséquilibre davantage le système en faveur de la formation d'ozone.

L'ozone est bien connu pour être un polluant atmosphérique phytotoxique, causant des dommages visibles sur les feuilles (lésions chlorotiques et nécrotiques), une réduction de la croissance, une perte de la productivité et pouvant finalement conduire à la mort de la plante. Mais Il est d'une importance cruciale de noter que

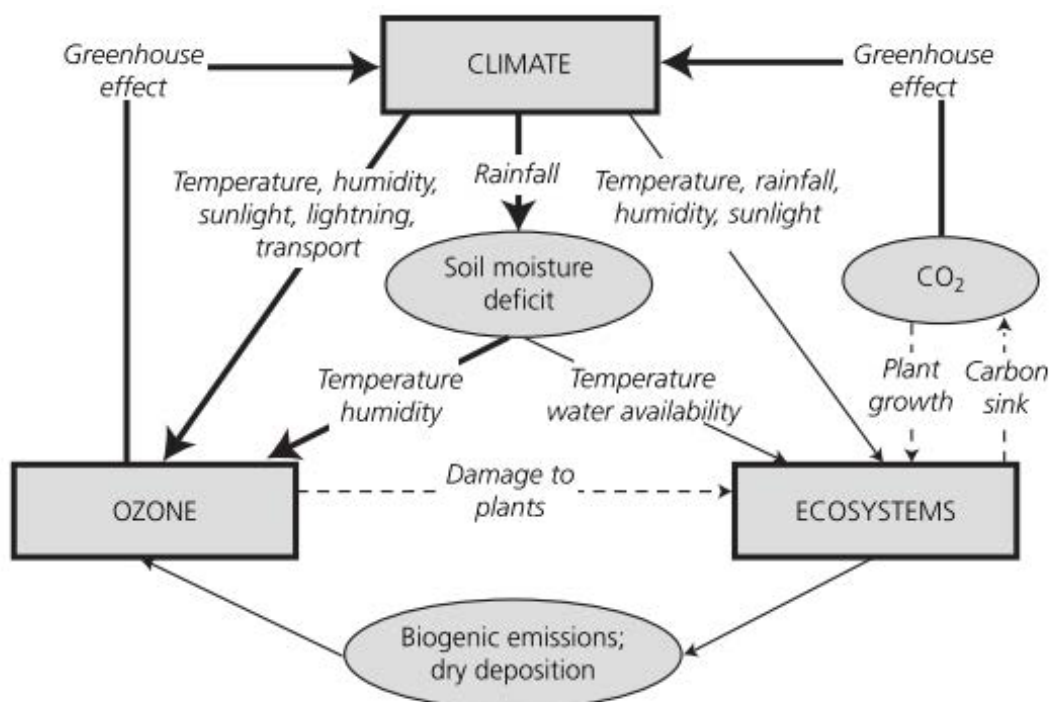


Figure 9. Représentation schématique des interactions entre le climat, les écosystèmes et l'ozone troposphérique. L'épaisseur des lignes pleines indique les processus qui sont généralement bien compris et représentés dans les modèles chimie-climat. Les lignes fines indiquent les processus pour lesquels il existe encore des incertitudes et qui ne sont que partiellement représentés dans les modèles. Les lignes en pointillés correspondent à des nouveaux liens qui sont généralement importants, mais non inclus dans les projections du modèle.

*D'après Ground-level ozone in the 21st century : future trends, impacts and policy implications (2008).*

l'exposition chronique d'ozone (de faibles concentrations d'ozone appliquées sur une longue période de temps) affecte les processus physiologiques et biochimiques, comme une diminution de la photosynthèse, avant le développement de tout dommage visible (Dizengremel, 2001; Dizengremel et al., 2008; Heath & Taylor, 1997).

### **2.3- La Détoxification**

L'ozone, ainsi que d'autres stressés abiotiques, peuvent induire la synthèse et/ou l'activation de plusieurs systèmes de détoxification des ROS, qui comprennent des métabolites antioxydants (acide ascorbique, glutathion, phénols, flavonoïdes,...) et de nombreux enzymes notamment des peroxydases (Cruz de Carvalho, 2008; Kangasjärvi, Jaspers, & Kollist, 2005; Wilkinson & Davies, 2010). Parmi les ROS, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), molécule stable non chargée, est capable de se propager rapidement à travers les membranes cellulaires (Bienert et al., 2007). De ce fait,  $H_2O_2$  est considéré comme une molécule de signalisation (Bienert et al., 2007) qui déclenche des défenses anti-oxydantes (Dizengremel et al., 2008) ou active la mort cellulaire programmée, quand elle est accumulée dans les tissus (Rao & Davis, 2001).

Parmi les enzymes capables de réduire  $H_2O_2$  figurent la catalase, les peroxydases et divers peroxyrédoxines (Dietz, 2003). Toutefois, l'un des principaux mécanismes de détoxification des ROS générés par des conditions de stress chez les plantes est le cycle Halliwell-Asada-Foyer ou cycle ascorbate-glutathion (Asada, 1999; Foyer & Noctor, 2011). Ainsi,  $H_2O_2$  produit spontanément à partir de la molécule  $O_3$  ou comme sous-produit de l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), est par la suite transformé via l'ascorbate peroxydase en eau et en

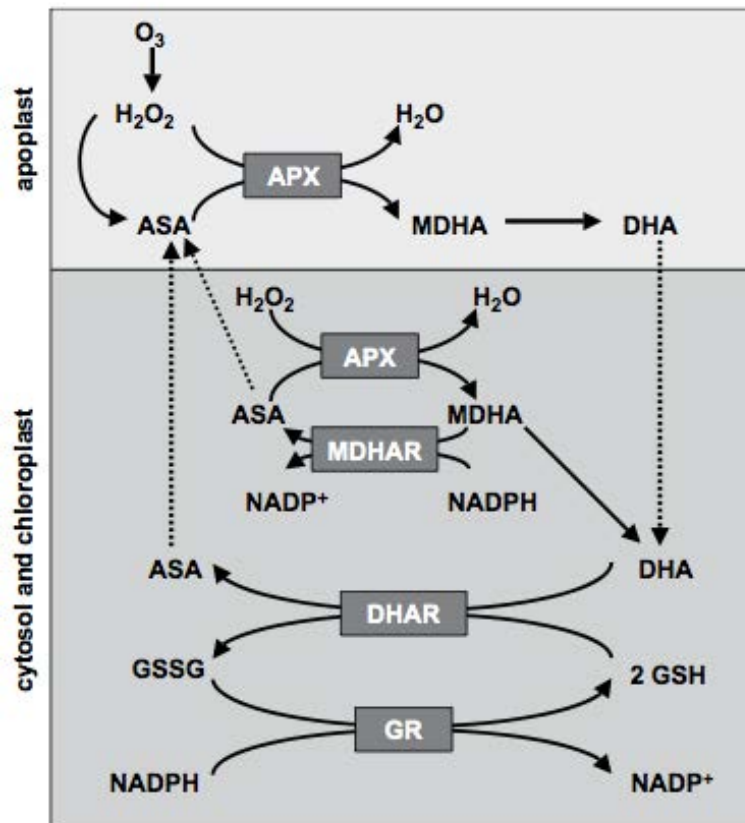


Figure 10. Réactions d'oxydoréduction de l'ascorbate dans l'apoplasme et le symplasme d'une cellule végétale exposée à l'ozone.

L'ascorbate réduit (ASA), directement oxydé par des ROS induits par l'ozone ou indirectement oxydé par des réactions liées à l'ascorbate peroxydase (APX) dépendante du piégeage d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, est recyclé en forme réduite par le cycle ascorbate-glutathion, ou cycle d'Halliwell-Asada-Foyer.

APX, ascorbate peroxydase; ASA, ascorbate réduit; DHA, déhydroascorbate; DHAR, déhydroascorbate réductase; GR, glutathion réductase; GSH, glutathion réduit; GSSG, glutathion oxydé; MDA, monodéhydroascorbate; MDAR, monodehydroascorbate réductase.

*D'après Castagna & Ranieri (2009).*



oxygène. Ce cycle ascorbate-glutathion qui neutralise également les ions superoxydes implique l'intervention de plusieurs enzymes parmi lesquelles : l'ascorbate peroxydase (APX), la dehydroascorbate réductase (DHAR), monodehydroascorbate réductase (MDHAR) et de la glutathion réductase (GR). La plupart des enzymes du cycle ascorbate-glutathion sont présentes dans les différents compartiments cellulaires : le cytosol, les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes (Jiménez, Hernandez, Del Rio, & Sevilla, 1997).

Plusieurs travaux ont montré que les réactions redox impliquant l'acide ascorbique sont cruciales pour augmenter la tolérance des plantes aux contraintes environnementales, notamment en réponse à l'ozone (Conklin & Barth, 2004; Dafré-Martinelli, Nakazato, Dias, Rinaldi, & Domingos, 2011). L'implication de l'ascorbate ne serait pas forcément en relation avec le statut redox du glutathion (Dafré-Martinelli et al., 2011). Le rôle antioxydant joué par l'ascorbate est strictement dépendant de la capacité de la cellule à le maintenir dans un état réduit. Cela se produit par l'intermédiaire de deux réactions catalysées par la monodehydroascorbate réductase (MDHAR) ou la déshydroascorbate réductase (DHAR) et utilisant respectivement du glutathion réduit (GSH) et du NADPH. Le glutathion est un puissant antioxydant régénéré par la glutathion réductase (GR), au détriment de l'oxydation du NADPH. L'ensemble de ces réactions montrent l'importance de la régénération de pouvoir réducteur dans les différents compartiments cellulaires afin d'alimenter le fonctionnement de ce cycle ascorbate-glutathion.

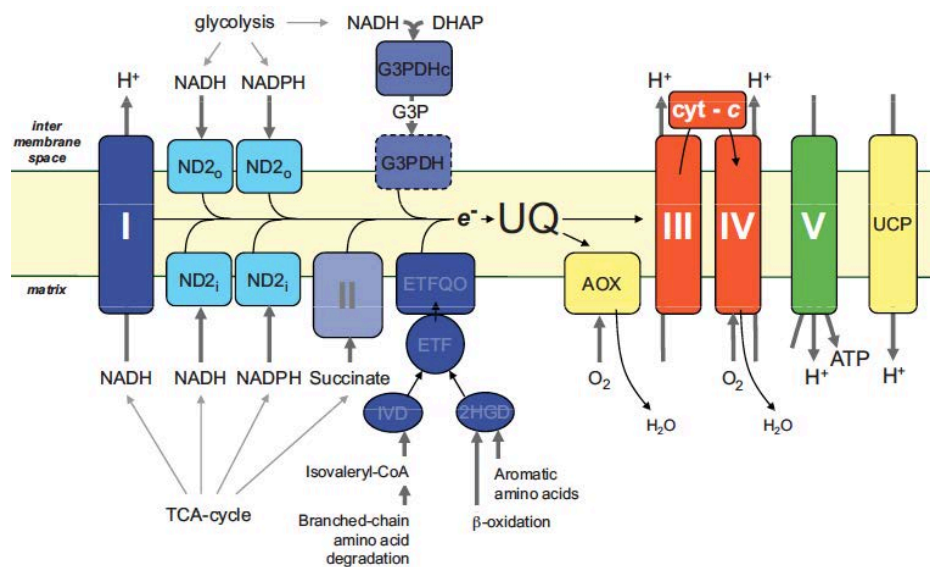


Figure 11. Schéma représentant la chaîne de transport d'électrons mitochondriale des végétaux.

Complexes I – V : NADH déshydrogénase, succinate déshydrogénase, cytochrome c réductase, cytochrome c oxydase, ATP synthase, respectivement. 2HGD : hydroxyglutarate déshydrogénase; AOX : oxydase alternative, cyt c : cytochrome c ; UCP : protéine découplante de plantes. ND2<sub>o</sub> : NAD(P)H déshydrogénase de type II, située sur la face externe de la membrane interne; ND2<sub>i</sub> : NAD(P)H déshydrogénase de type II, située côté matrice de la membrane interne; G3P : glycérate-3-phosphate; G3PDHc : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; IVD : isovenil déshydrogénase ; UQ : ubiquinone.

D'après Dongen et al (2011)

## 2.4- Le Métabolisme Énergétique

La photosynthèse et la respiration sont les principaux processus bioénergétiques coexistant dans les cellules foliaires des plantes. L'étude du métabolisme énergétique est d'une importance fondamentale dans la compréhension des mécanismes d'adaptation des plantes à des conditions défavorables.

Parmi plusieurs protéines membranaires de la cellule végétale, trois ont fait l'objet d'une attention particulière : l'oxydase alternative (AOX), la protéine découplante des plantes (pUCP) et l'oxydase plastidiale (PTOX). Les deux premières sont localisées dans la membrane interne des mitochondries alors que la PTOX est localisée dans la membrane thylakoïdale.

### 2.4.1- La Mitochondrie

La mitochondrie est l'une des principales sources de production d'énergie intracellulaire et constitue la réponse évolutive à l'enjeu majeur auquel les organismes vivants font face en ce qui concerne l'obtention d'énergie à partir de l'environnement pour répondre à leurs fonctions biologiques (Hughes & Criscuolo, 2008). Cette production d'énergie est associée à l'oxydation de composés organiques, tels que des lipides et des glucides, avec la libération de  $\text{CO}_2$  et la consommation d' $\text{O}_2$ . Elle est liée à l'utilisation d'une chaîne de transport d'électrons (ETC) située dans la membrane interne de la mitochondrie. Ce transport d'électrons est couplé au pompage de protons dans l'espace intermembranaire générant ainsi un gradient électrochimique ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ), utilisé par l'ATP synthase pour produire l'ATP.

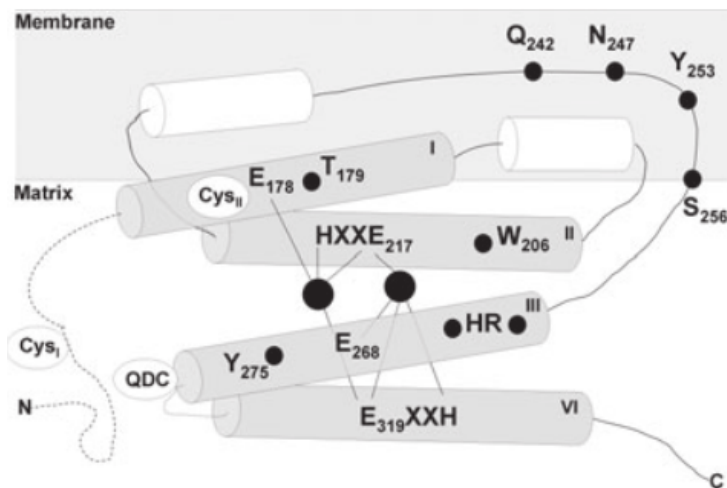


Figure 12. Structure tridimensionnelle de l'oxydase alternative de végétale (AOX).

Les cylindres gris représentent les quatre faisceaux d'hélices, les cercles noirs : les atomes de fer et les lignes en pointillés : les zones non modélisées à ce jour. Les positions approximatives des résidus cystéine conservés et les résidus d'acides aminés formant le site liaison de fer, sont indiquées.

*D'après Andersson et Nordlund (1999) et modifiée par Berthold et al. (2000)*

(Azzu, Jastroch, Divakaruni, & Brand, 2010; Dietrich & Horvath, 2010; Mailloux & Harper, 2011). Ce processus est appelé phosphorylation oxydative, nécessitant l'imperméabilité de la membrane mitochondriale interne aux protons (Mitchell, 1961).

La chaîne de transport des électrons des mitochondries végétales affiche une remarquable plasticité par rapport au flux d'électrons à partir d'un substrat. L'oxydation du NADH peut se produire via le complexe 1, qui assure aussi le transfert de protons de part et d'autre de la membrane, ou via des NAD(P)H déshydrogénases, situées sur la face externe ou interne de la membrane interne et insensibles à la roténone. L'oxydation de l'ubiquinol peut diriger les électrons vers la voie cytochromique, connectée au complexe 3 et à la cytochrome c oxydase, voie sensible au cyanure. En outre, les électrons à partir de l'ubiquinol peuvent être dirigés vers l'oxydase alternative (AOX), sans être couplés à un transfert de protons de part et d'autre de la membrane (Lance, Chauveau, & Dizengremel, 1985; Moore & Siedow, 1991). Plus récemment, la complexité de la chaîne respiratoire mitochondriale des végétaux s'est accrue avec la présence d'un homologue à la protéine découplante trouvée dans les mitochondries de cellules animales (pUCP), qui est proposé comme permettant la rentrée des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice, en contournant le complexe ATP synthase (Laloi, 1999; Vercesi et al., 1995).

#### **2.4.1.1- L'oxydase alternative (AOX)**

L'oxydase alternative, résistante au cyanure (AOX), est une protéine codée par le génome nucléaire et localisée dans la membrane interne des mitochondries de toutes les plantes supérieures. Elle catalyse une réaction de réduction de l'oxygène en H<sub>2</sub>O, insensible au cyanure et alternative à la voie cytochromique.



Chez les plantes, l'AOX est une protéine homodimère associée au côté matriciel de la membrane interne. La distribution de l'AOX ne se limite pas aux plantes, car elle se trouve dans de nombreux champignons et les protistes, y compris des organismes pathogènes tels que *Trypanosoma brucei* (Chaudhuri & Hill, 1996), le *Cryptosporidium parvum* (Roberts et al., 2004; Suzuki et al., 2004) et le *Blastocystis hominis* (Stechmann et al., 2008). Des homologues de l'AOX ont été identifiés chez les  $\alpha$ -protéobactéries (Atteia et al., 2004; Stenmark & Nordlund, 2003) et font leur apparition dans un large éventail d'espèces animales (McDonald, 2008; McDonald & Vanlerberghe, 2006). Un homologue de l'oxydase terminale est présent dans les chloroplastes (oxydase terminale des plastes (PTOX) et les cyanobactéries (Atteia et al., 2004).

L'un des rôles de l'AOX, associé à sa découverte, est associé à la pollinisation pour un petit nombre de plantes de la famille des Aracées, où elle est responsable de la production de chaleur et de la volatilisation de substances attractives pour les insectes (Lance et al., 1985; Meeuse, 1975; Wagner, Krab, Wagner, & Moore, 2008). La fonction de l'AOX chez les plantes non-thermogéniques reste cependant, l'objet de bien des débats, bien que les rôles proposés comprennent le maintien du fonctionnement du cycle de Krebs dans des conditions de stress (Mackenzie & McIntosh, 1999) et la prévention de l'accumulation des ROS qui peuvent endommager les composants cellulaires (D. P. Maxwell, Wang, & McIntosh, 1999; Purvis & Shewfelt, 1993; Wagner & Moore, 1997). Les premiers travaux sur le rôle de l'AOX ont conduit à conclure que son fonctionnement *in vivo* n'avait lieu que lorsque la voie cytochromique était saturée (Lambers, 1982). Plus récemment, un rôle de l'AOX dans l'homéostasie et la croissance de la plante a été proposé (Hansen et al., 2002) ainsi que le maintien de la flexibilité métabolique pour une adaptation rapide aux stress (Moore, Albury, Crichton, & Affourtit, 2002). L'AOX a été proposée comme un marqueur de la reprogrammation efficace des cellules sous





contrainte (Arnholdt-Schmitt, Costa, & Fernandes de Melo, 2006; Clifton, Millar, & Whelan, 2006).

L'élucidation de la structure de l'AOX a été entravée par la difficulté de purification de la protéine et d'analyse par des techniques spectroscopiques. En dépit de ces obstacles, notre compréhension de sa structure a considérablement progressé depuis la fin des années 1980 et il est généralement accepté que les AOX sont des membres de la famille des protéines de type di-fer, à laquelle appartient la monooxygénase du méthane (MMO), la sous-unité R2 de la ribonucléotide réductase (R2), la désaturase du stéaroyl-acyl ( $\Delta 9$ -désaturase), la rubrerythrine, ainsi que les ferritines et hémérythrine. Dans chacune de ces protéines, le site actif est encadré dans le faisceau de quatre hélices. La majorité de ces protéines contient deux motifs conservés EXXH avec les résidus glutamate et histidine contractant une liaison avec des atomes de fer. Les premières études de Siedow et collaborateurs ont conduit à la définition de motifs de liaison avec le fer dans un petit nombre de séquences d'AOX disponibles à l'époque et au modèle proposé de la structure de l'AOX dans lequel la protéine contient un centre avec un pont du type hydroxodi-fer résidant dans le centre du faisceau à quatre hélices, analogue au centre de fer dans les MMO (Moore, Umbach, & Siedow, 1995; Siedow, Umbach, & Moore, 1995). Avec les nombreuses séquences d'ADNc de l'AOX, le modèle du site actif a été révisé et maintenant la protéine AOX est considérée comme une protéine monotopique de la membrane interfaciale en interagissant avec une seule couche lipidique de la bicouche que forment les membranes (Andersson & Nordlund, 1999; Berthold, Andersson, & Nordlund, 2000).

Très peu d'informations sont disponibles sur le mécanisme catalytique par lequel l'AOX réduit l'oxygène en eau ainsi que la liaison avec des substrats, l'ubiquinol et l'oxygène, au niveau du site actif. Des hypothèses mécanistiques de l'AOX ont été suggérées par Affourtit et al. (2002) qui ont proposé quatre

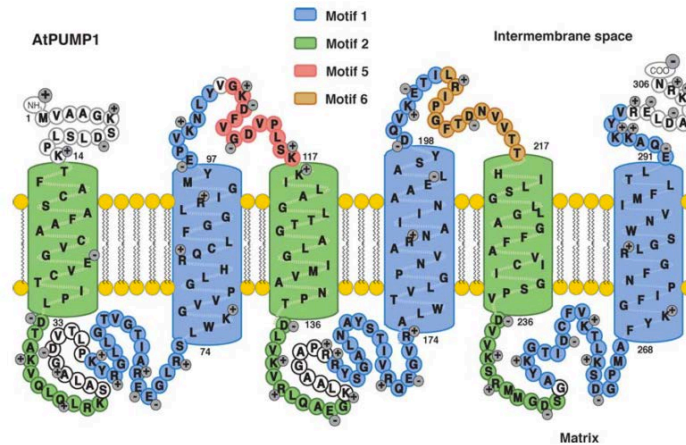


Figure 13. Schéma présentant les motifs conservés contenus dans la protéine *AtPUMP1*. Les motifs 1 et 2 sont communs à tous les membres de la sous-famille des protéines UCP. Les motifs 5 et 6 sont spécifiques aux pUCP et sont tous les deux exposés à l'espace intermembranaire.

*D'après Vercesi et al (2006)*

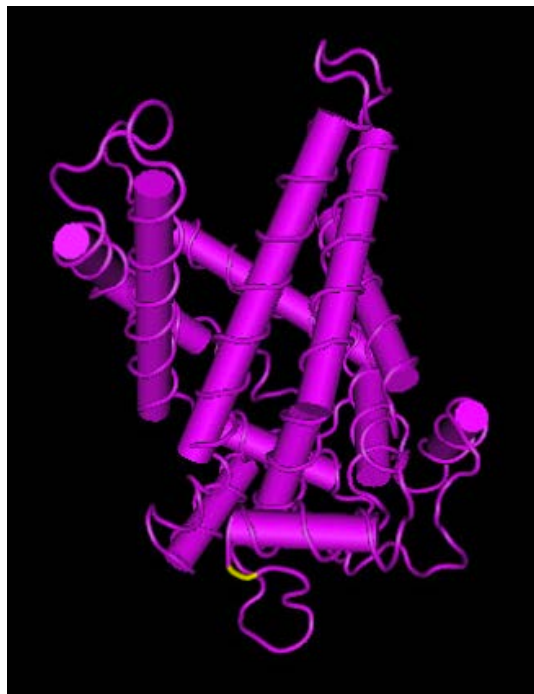


Figure 14. Représentation tridimensionnelle de la pUCP selon la structure 3D du transporteur ADP-ATP mitochondrial de bovin.

*D'après Hughes & Criscuolo (2008)*

mécanismes catalytiques potentiels.

L'AOX est codée par le génome nucléaire et importée dans les mitochondries (Tanudji, Sjöling, Glaser, & Whelan, 1999). Elle est codée par une petite famille multigenique de trois à cinq membres en fonction des espèces végétales et est régulée pendant le développement et dans différents tissus (Considine, Daley, & Whelan, 2001; Finnegan et al., 1997). Chez *V. unguiculata*, l'AOX est codée par une petite famille d'au moins trois gènes: *AOX1*, *2a* et *2b*. Ces trois gènes présentent un profil similaire aux gènes *AOX1* et *AOX2* de soja (Costa et al., 2010).

Si on considère que l'AOX peut avoir un rôle majeur dans le contrôle des fuites d'électrons dans la membrane mitochondriale interne qui conduit]sent à la formation de ROS (D. P. Maxwell et al., 1999; Purvis, 1997; Yip & Vanlerberghe, 2001), cette activité antioxydante est alors très importante dans les conditions de contraintes abiotiques comme la sécheresse et l'ozone connues pour induire un stress oxydant.

#### **2.4.1.2- La protéine découplante des plantes (pUCP)**

Lors de l'établissement du gradient de protons au cours du processus d'oxydation d'un substrat, le couplage avec le processus de la phosphorylation oxydative peut faire défaut. En effet, des protons peuvent revenir à la matrice mitochondriale par l'intermédiaire d'autres protéines, appelées protéines découplantes, également présentes dans la membrane mitochondriale interne (Divakaruni & Brand, 2011; Hourton-Cabassa, Rita Matos, Zachowski, & Moreau, 2004). Ainsi les protéines découplantes (UCPs) qui orchestrent le découplage entre le transfert des électrons et la synthèse d'ATP sont de fait impliquées dans la régulation de la phosphorylation oxydative (Vercesi et al., 2006). En conséquence, le



potentiel de la membrane est réduit et l'énergie produite par l'oxydation de substrats est perdue sous forme de chaleur. L'UCP joue un rôle fondamental dans les processus thermogéniques, comme le maintien de la température corporelle chez les petits mammifères, nouveaux-nés, acclimatés au froid et chez les mammifères en hibernation (Borecký & Vercesi, 2005; Chien, Wu, & Chen, 2011; Hourton-Cabassa et al., 2004; Ito-Inaba, Hida, & Inaba, 2009; Nicholls & Rial, 1999; Vercesi et al., 2006). Les travaux sur la thermogénèse dans les années 50 et au début des années 60 ont démontré que non seulement la respiration phosphorylante, mais aussi le transfert d'électrons découplé, pouvait avoir une importance physiologique (Skulachev, 1999). Dans les années 1970, une protéine de 32 kDa a été identifiée dans le tissu adipeux brun des mammifères, impliqué dans le processus de thermogénèse, appelé thermogénine, en raison de sa fonction (Ricquier & Kader, 1976). Pendant des décennies, on a cru en l'existence de cette enzyme exclusivement dans le tissu adipeux brun et elle a été considérée comme un marqueur de la mitochondrie animale, à la suite de son acquisition évolutive tardive (Klingenberg, 1990; Nicholls & Rial, 1999; Vercesi et al., 2006).

En 1995, Vercesi et al. ont identifié dans les mitochondries de pomme de terre une enzyme aux propriétés biochimiques similaires à l'UCP1 animal. Cette protéine a été nommée PUMP (Plant Uncoupling Mitochondrial Protein). La nomenclature PUMP pour la protéine découplante de plantes a été remplacée par pUCP (Plant Uncoupling Protein) pour éviter toute confusion avec le terme PUMP (Proton Pumps), utilisé pour les transporteurs impliqués dans le processus de transport actif (Borecký et al., 2001). La découverte de cette enzyme dans le règne végétal a stimulé la recherche d'autres homologues aux UCPs chez les plantes, les animaux et les autres eucaryotes (Borecký et al., 2001; Boss et al., 1997; Bouillaud et al., 1994; Cavalheiro, Fortes, Borecký, Faustloni, & Schreiber, 2004; Fleury et al., 1997;



Jarmuszkiewicz, Sluse-Goffart, Hryniewiecka, & Sluse, 1999; Jarmuszkiewicz, Behrendt, Navet, & Sluse, 2002).

L'UCP exerce donc un effet découplant sur les processus d'oxydation-phosphorylation auquel s'ajoute une plus faible production de ROS (Vercesi et al., 2006). Par conséquent, elle a aussi une activité antioxydante. L'expression des gènes codant pour la pUCP ainsi que son activité dans les plantes sont encore mal connues et très peu d'études sont consacrées à l'évolution parallèle de la régulation de l'AOX et de la pUCP. La pUCP est présentée comme une famille multigénique dont au moins 6 membres chez *Vigna unguiculata* (*VuUCP1a*, *1b*, *2*, *3*, *4* et *5*). Par ailleurs, des études avec la pUCP ont suggéré que *AtUCP1* d'*Arabidopsis* prédomine en terme d'expression (Sweetlove et al., 2006) et deux gènes (*AtUCP1* et *AtUCP5*) ont été montrés comme étant sur-régulés par la sécheresse (Kreps et al., 2002; Vercesi et al., 2006). Plus récemment et basé sur des homologues de séquences, les gènes d'*Arabidopsis* *AtPUMP4*, *5* et *6*, ont été reclassés comme des gènes codant pour des transporteurs d'acides dicarboxyliques (*DIC1*, *DIC2* et *DIC3*) (Palmieri et al., 2008).

#### **2.4.2- Les Plastes et Les Chloroplastes**

Les plastes ne se trouvent que dans les cellules de plantes et d'algues. Ils sont responsables pour la photosynthèse et le stockage de produits divers ainsi que la synthèse de molécules clés requises pour l'architecture et le fonctionnement des cellules végétales. Les plastes sont dérivés de l'endosymbiose de cellules procaryotes, pendant la symbiogenèse. La plupart des gènes de l'organisme symbionte ont été perdus ou transférés vers le noyau de la cellule hôte. Le génome plastidial des plantes supérieures code pour environ 87 protéines (Peltier &





Cournac, 2002). Toutefois, ceux-ci ne représentent qu'une fraction de la totalité des protéines requises pour la biogenèse et le fonctionnement du chloroplaste (Aluru & Rodermel, 2004). Un modèle a été proposé pour la biogenèse et la différenciation des divers types de plastes. Dans ce modèle sont identifiés sept étapes dans la voie du développement de plastes: proplaste, amyloplaste et plaste amiboïde, qui sont regroupés dans les premiers stades du développement comme des proplastones non-verts, les leucoplastes et etioplastes. Dans les feuilles et au stade de maturité le chloroplaste est photosynthétiquement actif, puis subit au cours du vieillissement « une sénescence ». Citons encore les chromoplastes présents dans les fruits et dans les fleurs (Tilney-Bassett & Almouslem, 1989).

Chez les eucaryotes, les réactions biophysiques et biochimiques de la photosynthèse se produisent dans un plaste spécialisé, le chloroplaste. Les chloroplastes de plantes supérieures ont un système à double membrane appelé enveloppe et consistant en une membrane externe et une membrane interne. La membrane interne dite membrane thylakoïde entoure le compartiment intérieur. Ce compartiment contient des vésicules aplaties ou des sacs appelés thylakoïdes, qui sont généralement disposés en piles appelées grana. Le lumen est la phase aqueuse présente au centre des thylakoïdes et délimitée par la membrane du thylakoïde. Les pigments photosynthétiques et les complexes enzymatiques qui favorisent les réactions de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique sous forme d'ATP sont incorporés dans les membranes des thylakoïdes alors que les enzymes nécessaires pour les réactions d'assimilation du carbone sont dans le stroma.

Les chloroplastes, comme les mitochondries, ont une chaîne de transport d'électrons couplée à la synthèse d'ATP. L'excitation des photosystèmes I et II et l'oxydation subséquente de ceux-ci conduisent à la production d'O<sub>2</sub> et de NADPH+H<sup>+</sup> ainsi qu'à la génération d'un gradient de protons permettant la

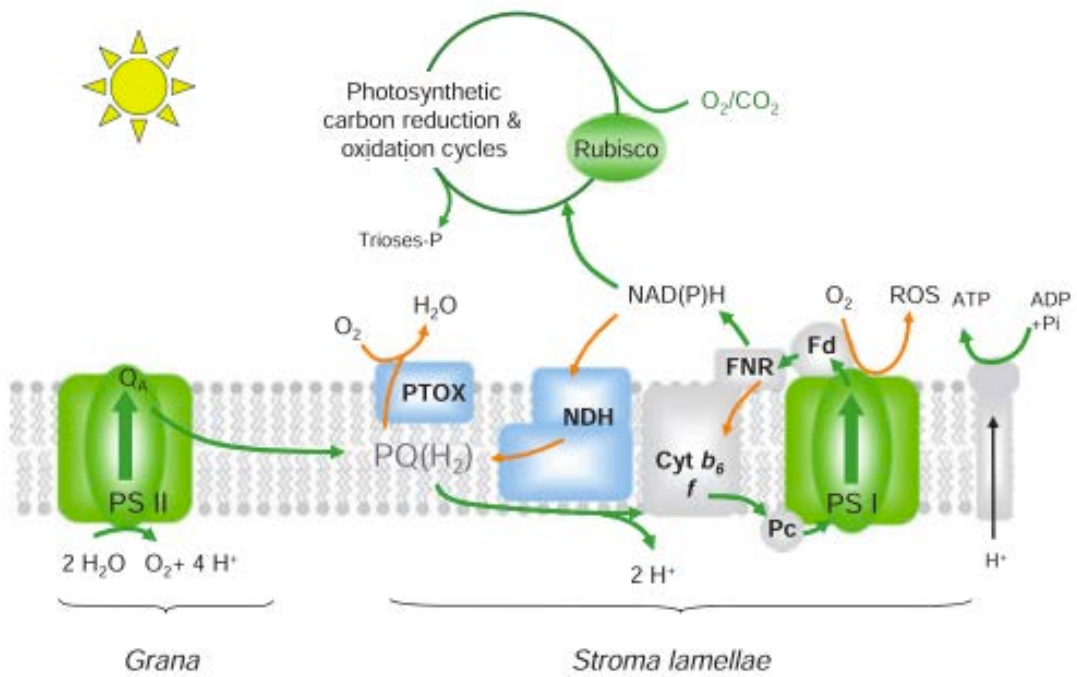


Figure 15. Schéma présentant les réactions de transfert d'électrons au niveau des thylakoïdes.

D'après Rumeau, Peltier, et Cournac (2007)

synthèse d'ATP (Cournac et al., 2000). Bien que la lumière soit essentielle pour effectuer la photosynthèse, l'appareil photosynthétique est sensible aux dommages induits par la lumière provoquant des fuites d'électrons et la production inévitable d'intermédiaires réactifs ou espèces réactives de l'oxygène. La production d'oxygène par les plantes a été démontré par Priestley en 1771, quand il a observé qu'une bougie allumée dans une enceinte close en verre ne s'éteignait pas en présence d'une plante. En 1779, Jan Ingenhousz, montra que la lumière était essentielle pour la production d'oxygène par les plantes (Taiz & Zeiger, 2004).

Beaucoup plus tard, le chloroplaste et les thylakoïdes ont été identifiés comme le site de production d'oxygène dans les phototrophes, à partir de l'eau. En 1937, Robert Hill, a constaté la production d' $O_2$  que lorsqu'un extrait de feuille contenant des chloroplastes est éclairé. Par la suite Severo Ochoa a montré que la  $NADP^+$  est l'accepteur d'électrons dans le chloroplaste (Taiz & Zeiger, 2004).

En 1951, Mehler montra la consommation d'oxygène en présence de lumière à partir de l' $O_2$  à  $H_2O_2$  dans thylacoïdes par détection de la formation d'acétaldéhyde et d'éthanol en présence de catalase (Asada, 1999).

#### **2.4.2.1- La chlororespiration**

La photosynthèse et la respiration, sont les deux principaux processus bioénergétiques des organismes vivants qui coexistent dans les cellules végétales. Alors que la chaîne de transport des électrons de la photosynthèse est clairement limitée aux chloroplastes, la chaîne de transport des électrons de la respiration cellulaire, initialement limitée à la mitochondrie, est également présente (au moins partiellement) dans les chloroplastes (Bennoun, 2002; Cournac, Josse, et al., 2000). Cette respiration du chloroplaste, appelée chlororespiration pour la différencier de le



mitorespiration, a probablement son origine dans les anciennes cyanobactéries endosymbiotiques du chloroplaste (Scherer, 1990).

La première preuve de l'oxydation non-photochimique de la plastoquinone provenait d'études sur le métabolisme  $H_2$  des microalgues. Gaffron & Rubin, en 1942, ont observé que les algues vertes unicellulaires tels que *Chlamydomonas* ou *Scenedesmus obliquus*, dans des conditions anaérobies, catalysent la réduction de  $CO_2$  en utilisant  $H_2$  comme donneur d'électrons. Ces réactions avaient besoin de l'activité du PSI et une période d'ajustement dans des conditions anaérobies pour initier la biosynthèse et/ou l'activation d'une hydrogénase responsable de la catalyse d'une réaction réversible. La production de  $H_2$ , ainsi que la réduction de  $CO_2$  dépendant du  $H_2$ , sont des processus insensibles à l'herbicide 3 - (3,4-dichlorophényl) -1,1-diméthylurée (DCMU), montrant donc que les électrons proviennent d'une source différente de celle PSII. Cependant, ces réactions sont sensibles à la 2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl-p-benzoquinone (DBMIB), un analogue de quinones, inhibiteur du cytochrome *b<sub>6</sub>f*, et démontrant dans ce cas, l'implication de plastoquinones (Gfeller & Gibbs, 1985; Godde & Trebst, 1980; Maione & Gibbs, 1986).

La chlororespiration est donc défini comme le transport des électrons provenant de l'oxydation de molécules endogènes (NADH ou NADPH) en passant par le «pool» de quinones, et au final transférés à l' $O_2$ , grâce à une oxydase terminale similaire à l'oxydase alternative des mitochondries (Kuntz, 2004).

Pendant longtemps, il a été spéculé sur l'existence éventuelle de la PTOX mais c'est seulement en 1999 qu'elle a été isolée et caractérisée chez un mutant d'*Arabidopsis* (Carol et al., 1999; Wu, Wright, Wetzels, Voytas, & Rodermel, 1999). Ce mutant d'*Arabidopsis*, appelé "IMMUTANS", avait un phénotype appelé « variegata » avec quelques zones dépigmentées lorsque la luminosité était de faible ou moyenne intensité. Toutefois, lorsque les plantes ont été exposés à des



niveaux élevés de luminosité, leurs feuilles ont été presque totalement dépigmentées, montrant une réponse insuffisante ou inadéquate au stress photooxydant. L'existence de ce phénotype est liée à l'accumulation de phytoène, le premier précurseur dans la synthèse des caroténoïdes (Carol & Kuntz, 2001).

La chlororespiration est donc une voie alternative d'électrons comportant la réduction de plastoquinones (PQ) par l'action de la NDH (NADH réductase du chloroplaste), l'oxydation des plastoquinones réduites par l'oxydase terminale plastidial (PTOX) avec la réduction de l'oxygène en eau (Aluru & Rodermeil, 2004; Bennoun, 2002; Nixon, 2000). Il est connu que, dans des conditions normales de saturation de la chaîne de transport des électrons (régime «Z»), les chloroplastes gèrent un transport d'électrons cyclique dans le but de contrôler la lumière à travers un mécanisme de quenching non-photochimique de la fluorescence de la chlorophylle (NPQ) (Johnson, 2005).

L'action conjointe du complexe NDH et de la PTOX permet d'optimiser l'efficacité du transport d'électrons cyclique en équilibrant l'état redox des transporteurs d'électrons entre les photosystèmes. Dans des conditions de stress, un des rôles de ces composants serait d'éviter la sur-réduction des accepteurs d'électrons du PSI, et ainsi d'éviter la formation des ROS et donc assurer la protection du PSI d'une photoinhibition (Rumeau, Peltier, & Cournac, 2007).

Différents groupes de recherche ont tenté de quantifier le flux d'électrons à travers la chlororespiration (Bennoun, 1982; Büchel & Garab, 1995; Feild, Nedbal, & Ort, 1998; Peltier, Ravenel, & Verméglio, 1987). Toutefois, ces estimations doivent être pris avec prudence sur la base de mesures d'oxydation des PQ, en donnant des électrons à l' $O_2$ , qui sont susceptibles d'être modifiées lorsqu'il ya des variations dans la respiration mitochondriale (Feild et al., 1998). D'autres approches ont été tentées par l'utilisation d'inhibiteurs de la chaîne de transport des électrons des mitochondries. L'utilisation du cyanure n'a eu aucun effet sur la chlororespiration

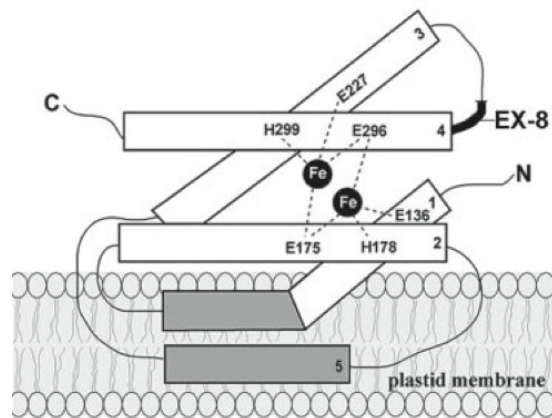


Figure 16. Modèle structurel proposant la PTOX comme une protéine de la membrane plastidiale avec un centre di-fer dans le site actif.

D'après Rodermeil (2002).

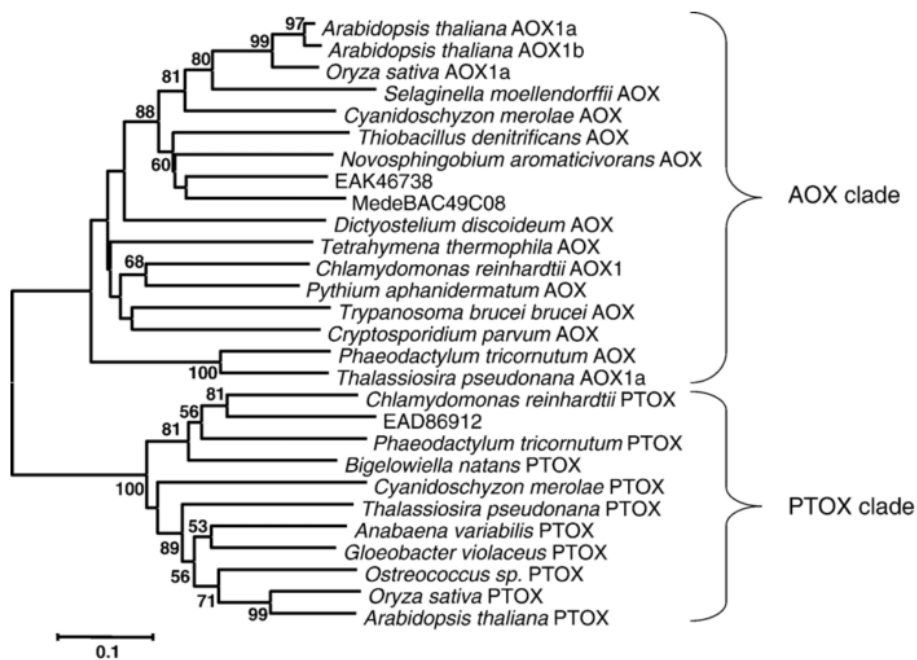


Figure 17. Arbre phylogénique obtenu à partir des protéines générées avec des séquences d'AOX et PTOX provenant d'organismes procaryotes et eucaryotes, qui démontre la séparation des clades AOX et PTOX.

D'après McDonald and Vanlerberghe (2006).



mais le propylgallate, inhibiteur de l'AOX mitochondriale inhibe la quinol oxydase de la chlororespiration dans les cellules de *Chlamydomonas* (Cournac, Josse, et al., 2000; Cournac, Redding, et al., 2000; E. Josse et al., 2000). Dans ces cellules, le taux de consommation d'O<sub>2</sub> attribué à la chlororespiration a été estimé à environ 50 nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>de chlorophylle, représentant environ 2% de la vitesse d'écoulement maximale des électrons de la photosynthèse (Cournac et al., 2002). Une autre façon d'évaluer l'importance de la chlororespiration est de déterminer l'abondance relative des complexes de la chlororespiration des membranes des thylakoïdes. Dans les plantes en C3, dans des conditions optimales pour le développement, NDH est un composant mineur de la membrane des thylakoïdes, ce qui représente environ 0,2% des protéines totales présentes (Sazanov, Burrows, & Nixon, 1998). Ainsi, par rapport au processus de la photosynthèse, la chlororespiration semble être quantitativement plus faible au moins dans les chloroplastes des plantes supérieures (Peltier & Cournac, 2002).

#### **2.4.2.2- L'oxydase plastidiale (PTOX)**

Les protéines de type carboxyle di-fer (groupe auquel appartiennent la PTOX et l'AOX) sont très anciennes, car elles sont présentes dans tous les règnes (y compris les archéobactéries) aussi bien chez les aérobies que chez les anaérobies (Gomes, Gall, Xavier, & Teixeira, 2001). Comme évoqué dans le paragraphe concernant l'AOX, cette classe de protéines est caractérisée par un centre de deux atomes de fer non hémique (dans laquelle les résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison de métal sont hautement conservées), contenu à l'intérieur d'une conformation de quatre  $\alpha$ -hélices structurellement conservées (McDonald & Vanlerberghe, 2006). La PTOX est codée par un gène nucléaire et synthétisée



comme un précurseur de la protéine contenant une extension N-terminale qui est clivée avant d'être importée dans le chloroplaste (Carol et al., 1999). Les séquences d'AOX et de la PTOX présentent une grande homologie et toutes les deux présentent sur le site C-terminal de liaison un atome de fer (Carol & Kuntz, 2001). Mais des analyses phylogénétiques ont montré que la PTOX et l'AOX sont groupés en familles distinctes (Carol & Kuntz, 2001). Les gènes de la PTOX sont présents chez les monocotylédones (Kong, Gong, Zhang, Zhang, & Chen, 2003) et chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Un gène homologue à la PTOX est également présent dans une amibe *Bigelowiella natans* (Archibald, Rogers, Toop, Ishida, & Keeling, 2003), résultat d'un événement endosymbiotique secondaire. Fait intéressant, les gènes homologues aux PTOX se trouvent dans la cyanobactérie *Anabaena* sp. PCC7120 (Kaneko, 2001), *Prochlorococcus marinus* tr. MED4 (Rocap et al., 2003), ainsi que dans *Gloeobacter violaceus* PCC7421, une cyanobactérie qui n'a pas de chloroplastes (Nakamura et al., 2003). Ces observations suggèrent une origine procaryote à la PTOX (Kuntz, 2004).

Chez les plantes, les résultats d'expériences utilisant la technique du « light shift » indiquent que la PTOX est exprimée précocement dans le développement des cotylédons (Röbbelen, 1968; Wetzler, Jiang, Meehan, Voytas, & Rodermel, 1994). Au cours de cette phase de réponse à la lumière, le phénotype du cotylédon est irréversiblement déterminé en fonction de la luminosité ambiante. Le modèle de «taches blanches» et la localisation des PTOX dans les chloroplastes indiquent également que la PTOX est active dans les feuilles. Cela a été confirmé par une expérience utilisant des promoteurs PTOX et le gène rapporteur GUS. Ces expériences ont également montré que l'expression de PTOX ne semble pas restreinte aux tissus verts, mais omniprésente dans les tissus et les organes d'*Arabidopsis* au cours du développement (Aluru, Bae, Wu, & Rodermel, 2001). Dans ces tissus une accumulation importante des transcrits de la PTOX



concomitante avec l'accumulation de phytoène est démontrée, corroborant l'idée que la PTOX est impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes. Il a été également montré que les niveaux de transcripts PTOX sont augmentés au cours de la maturation des fruits de tomate et dans les poivrons (Josse et al., 2000). Cependant, l'expression ubiquitaire de la PTOX soulève la question de ce que serait sa fonction dans les tissus de couleur non verte, en particulier les racines qui n'accumulent pas des quantités appréciables de caroténoïdes (Aluru & Rodermel, 2004).

Plusieurs études soulignent que la PTOX et la chaîne respiratoire du chloroplaste, la chlororespiration, sont sur-régulés, au niveau activité et même au niveau quantité des protéines, quand les plantes sont soumises à des contraintes abiotiques, comme la sécheresse et la salinité (Ibáñez, Ballester, Muñoz, & Quiles, 2010; Stepien & Johnson, 2009) mais les études sur l'expression génique PTOX sont encore rares. Le rôle essentiel attribué à l'oxydase plastidiale (PTOX) consiste à limiter la production de ROS dans les chloroplastes (Josse, Alcaraz, Laboure, & Kuntz, 2003). Cependant, ce rôle est encore très controversé (Rosso et al., 2006; Stepien & Johnson, 2009) et l'importance de cette activité dans des conditions de stress oxydatif reste à déterminer.

Au final, le rôle métabolique et physiologique de ces protéines (AOX et PTOX) fait encore l'objet d'intenses recherches (McDonald & Vanlerberghe, 2006), mais des travaux abordant la co-régulation de ces protéines et le « cross-talk » entre les deux organelles chez les plantes soumises à des contraintes abiotiques sont presque inexistants.



# MATERIEL & METHODES





### 3- L'APPROCHE EXPERIMENTALE

#### 3.1- Matériel végétal et conditions de culture

L'étude a été menée sur les plantes de niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp), issus de deux cultivars différents. Parmi plusieurs cultivars existant de *Vigna unguiculata*, deux ont été choisis pour cette étude. Le premier, EPACE, cultivar développé par Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará est adapté à des régions semi-arides du nord-est du Brésil. Le second cultivar choisi a été le 1183 qui est originaire des régions humides de la Chine et a été fourni par l'équipe du Pr Anne Repellin de l'Université de Paris-Est à Creteil. Ces cultivars ont été précédemment sélectionnés par cette équipe pour leur différence de réponse vis-à-vis de la sécheresse (cv. EPACE, plus tolérant à la sécheresse, et cv. 1183, plus sensible à la sécheresse).

Les graines sont désinfectées après immersion dans une solution de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  0,5% pendant 5 minutes puis rincées à l'eau du robinet. Les graines sont ensuite placées dans des pots plastique de 5 L (1 graine par pot) contenant du compost (N/P/K 14/16/18, 1,2  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , Gramoflor repiquage ) fertilisé avec 15 g de granulés nutritive à libération lente (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2, Fertil, Boulogne-Billancourt, France). Les plantes ont été cultivées pendant deux semaines dans des salles de culture dans des conditions strictement contrôlées (14h jour à une luminosité de  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  au niveau des plantes, 25/20 °C (jour/nuit), 80% d'humidité). Pendant cette période, toutes les plantes ont été arrosées avec de l'eau du robinet conservée à température ambiante. Après cette période, les plantes ayant atteint le même stade de développement ont été transférées dans les chambres phytotroniques (figure 18) (120 cm de large par 117 cm de profondeur et 204 cm de haut) dans les mêmes conditions que précédemment décrites. Après une période d'acclimatation d'une semaine, les plantes ont ensuite été soumises

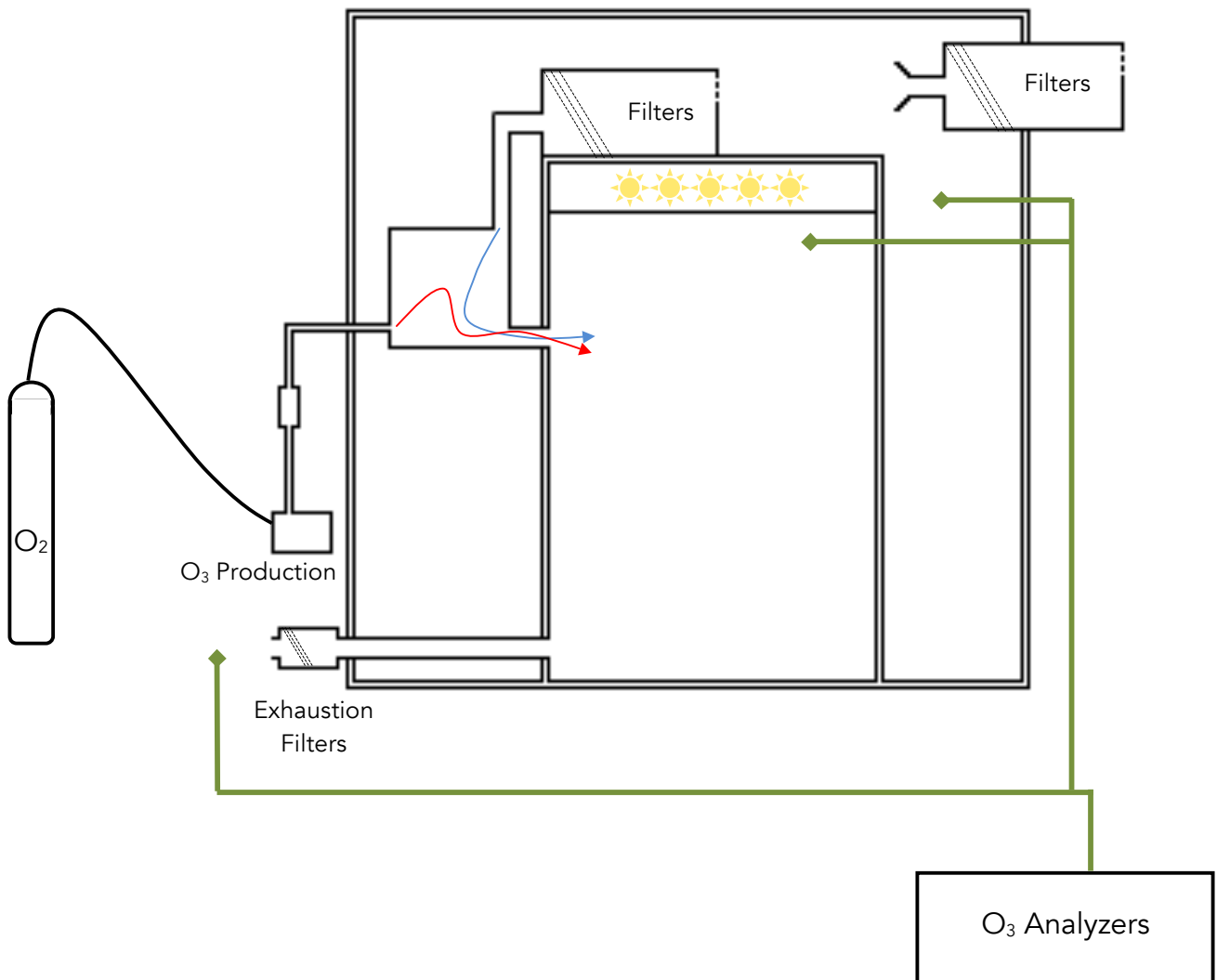


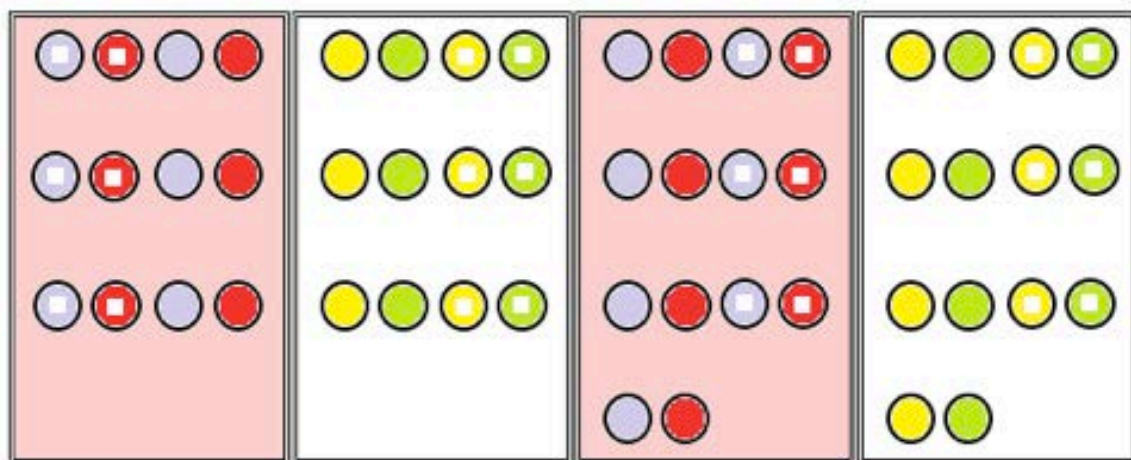
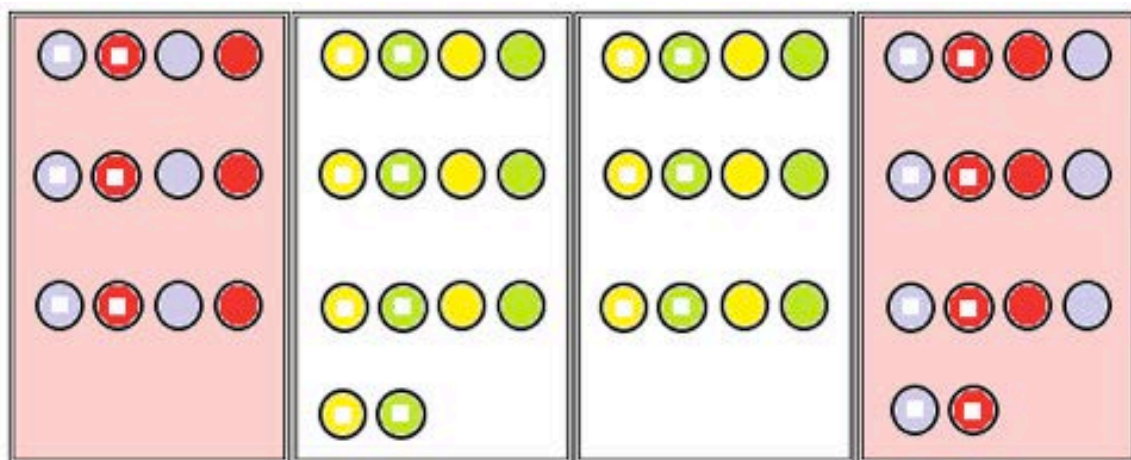
Figure 18. Schéma du dispositif expérimental de fumigation à l'ozone

pendant 14 jours aux conditions suivantes: fumigation O<sub>3</sub> (120 ppb ± 10 ppb) pendant 12 heures par jour, arrêt d'arrosage (sécheresse), et une combinaison de la sécheresse et O<sub>3</sub> appliquées simultanément. Au total 104 plantes (52 plantes de chaque cultivar) ont été distribués dans huit chambres de fumigation: 4 avec air filtré par un filtre à charbon (CF), 4 avec air filtré et enrichi en O<sub>3</sub>. Dans chaque chambre la moitié des plantes a été soumise à l'arrêt d'arrosage, tandis que l'autre moitié a été régulièrement arrosée avec de l'eau du robinet. En résumé, 26 plantes sont considérés comme contrôle (C), 26 plantes ont été soumis à l'arrêt d'arrosage (D), 26 plantes ont été exposés à l'O<sub>3</sub> et gardés bien arrosée (O), 26 plantes ont été exposés à l'O<sub>3</sub> et privés d'eau au en même temps (D + O). Pour chaque traitement, les 26 plantes sont donc réparties dans quatre chambres phytotroniques (figure 19).

### 3.1.1- Le dispositif de fumigation

L'ozone est produit à partir d'oxygène pur par deux générateurs (OZ500 Fischer, Bonn, Allemagne, et CMG3-3 Innovatec II, Rheinbach, Allemagne). Au sein de ces deux générateurs, les molécules de dioxygène (O<sub>2</sub>) sont dissociées par un arc électrique et se réassocient de façon aléatoire, formant des molécules d'ozone (O<sub>3</sub>). L'ozone ainsi produit est injecté dans le circuit de ventilation des chambres de fumigation. La régulation de ce flux est assurée par des débitmètres, et la concentration en ozone dans l'ensemble du dispositif est mesurée en continu à l'aide d'un analyseur UV (O341M, Environment S.A., Paris, France) associé à une station d'acquisition informatique.

Les chambres de fumigation sont des enceintes climatisées. L'éclairage, assuré par cinq lampes à vapeur de sodium (Son-T Agro, Philips, Eindhoven, Pays-Bas), permet d'atteindre un PPFD de 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  au niveau des plantes. L'intensité lumineuse a été mesurée dans toutes les chambres en fonction de la



- Epace Control
- Epace Drought
- 1183 Control
- 1183 Drought
- Epace Drought + Ozone
- Epace Ozone
- 1183 Ozone
- 1183 Drought + Ozone

Figure 19. Schéma de distribution des plantes dans les chambres phytotroniques.

distance au plafond. Température et degré d'hygrométrie sont mesurés deux fois par heure dans chaque chambre en même temps que la concentration en ozone (figure 18).

### 3.1.2- Procédure de fumigation

La période de fumigation d'ozone quotidienne commençait 2 h après le début de la photopériode et continuait pendant 12h jusqu'à l'extinction des lampes (figure 21). En général 1h est nécessaire pour que le niveau d'ozone atteigne la concentration souhaitée dans les chambres (120 ppb  $\pm$  10 ppb). Les plantes ont été soumises à la fumigation avec l'ozone pendant 14 jours sans interruption (figure 20).

Des échantillons de feuilles ont été récoltés sur la première feuille trifoliée, qui s'est entièrement développée au début des traitements. Des échantillons de feuilles ont été rapidement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 ° C pour des analyses ultérieures (figure 22).

### 3.1.3- Les indices d'exposition à l'ozone

La dose d'exposition à l'ozone peut être estimée à l'aide de l'indice AOT40 basée sur la dose cumulée d'ozone au-dessus d'une concentration limite de 40 ppb) et l'indice de POD<sub>γ</sub> basé sur les flux d'ozone entrant dans la feuille (dose d'ozone phytotoxique sur un seuil de flux instantané de  $\gamma^{-2}$  nmol.m.s<sup>-1</sup>). Le calcul de ces indices peut être réalisé selon les formules suivantes (Mills et al., 2011) :

$$AOT40 = \sum_{i=1}^N \max(c_i - 40, 0) \Delta t$$

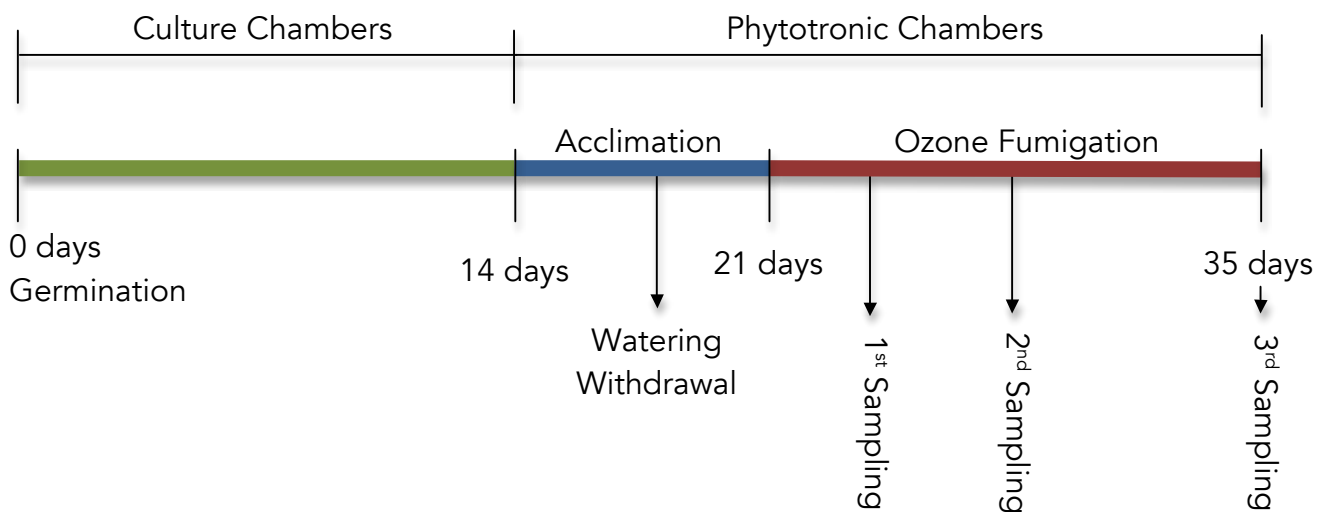


Figure 20. Schéma de l'expérience

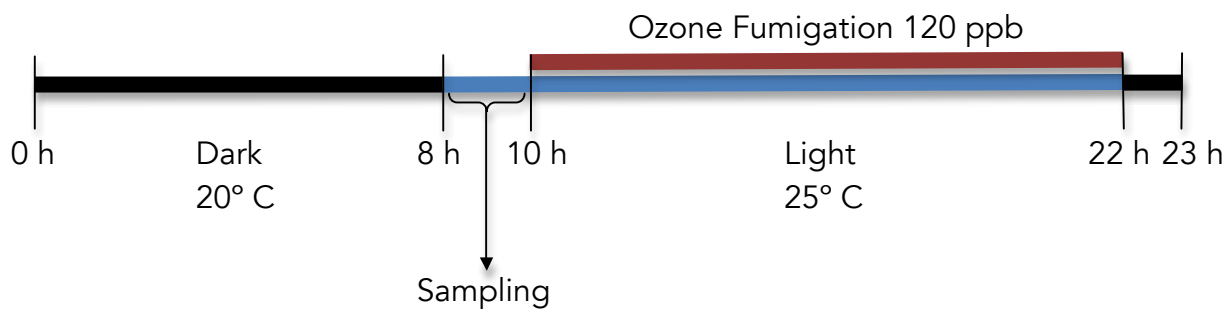


Figure 21. Schéma de la fumigation à l'ozone dans une journée

et,

$$POD_Y = \sum_{i=1}^N \max(F_{st,i} - Y, 0) \Delta t$$

Le calcul de l'AOT40 et  $POD_0$  est basé sur des valeurs horaires de la concentration d'ozone ( $c_i$  en ppb) ou flux stomatique ( $F_{st,i}$  en  $\text{mmol.m}^{-2}$ ), respectivement.  $N$  désigne le nombre d'heures de la période que doit être inclus dans le calcul et  $\Delta t = 1$  h. Seulement les heures de jour ont été prises en compte. L'absorption stomatique de l'ozone ( $F_{st}$ ) a été calculée comme décrit par Bagard et al. (2008).

### 3.2- Mesures de la fluorescence chlorophyllienne

Le principe de la mesure de la fluorescence chlorophyllienne est basé sur le fait que lorsqu'un quanta d'énergie lumineuse est absorbé par une molécule de chlorophylle, la totalité de cette énergie est transférée à ses électrons de valence. Ces électrons « excités » retournent à leur état initial en libérant l'énergie absorbée de trois manières : photochimie (P), dissipation sous forme de chaleur (H) et réémission de fluorescence (F). Comme ces trois phénomènes entrent en compétition, la mesure de la fluorescence chlorophyllienne peut donner des informations sur les deux autres processus (Maxwell & Johnson, 2000). Probablement, le paramètre le plus utile dans cette approche de fluorescence, est celui qui mesure la proportion d'énergie absorbée et utilisée en photochimie, à savoir le rendement quantique de la photochimie. Si la mesure est à l'obscurité, le rendement quantique intrinsèque est exprimée en  $F_v/F_m$ . En présence de lumière, le rendement quantique intrinsèque est donnée par  $\Phi_{PSII}$  (Genty, Briantais, & Baker,

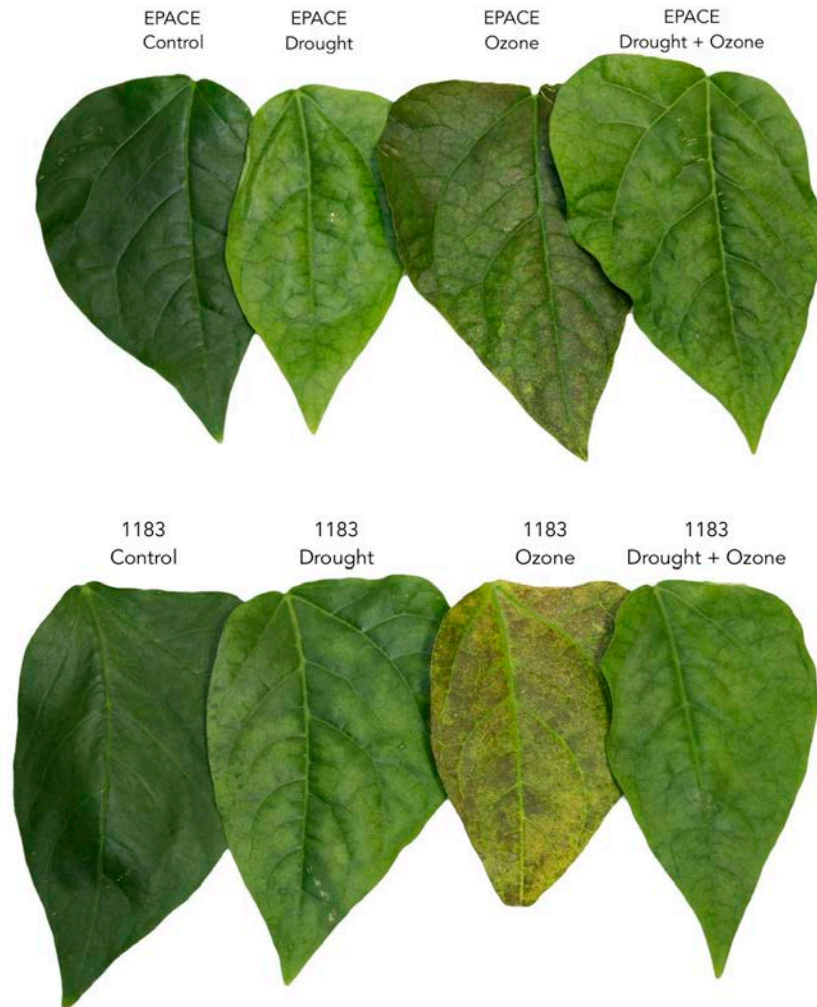


Figure 22. Exemple de feuilles (foliole de la première feuille trifolié) à la fin de l'expérimentation (35 jours)



1989). Le  $\Phi_{PSII}$  a été utilisé pour le rendement quantique de la photochimie en général, mais, dans un sens plus restreint, il est utilisé pour le rendement quantique efficace à la lumière.

L'émission de fluorescence de la chlorophylle a été mesurée sur la surface supérieure de la feuille à l'aide d'un fluorimètre impulsion modulée (FMS 1, Hansatech, Norfolk, Royaume-Uni). Tout d'abord,  $F_o$  et  $F$  (minimum de rendement de fluorescence des feuilles à l'obscurité et adaptée à la lumière, respectivement), ainsi que  $F_m$  et  $F'_m$  (rendement maximal de fluorescence des feuilles à l'obscurité et adaptée à la lumière, respectivement) ont été obtenus avec l'application d'une impulsion de saturation. Le rapport  $F_v/F_m$  et le rendement quantique du PSII efficace ont été calculés selon Genty et al. (1989) par les formules :

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m}$$

et

$$\Phi_{PSII} = \frac{F'_m - F_o}{F'_m}$$

D'un autre côté le quenching non-photochimique (qN) a été calculée pour donner une estimation de la quantité d'énergie qui a été utilisée par des processus non-photochimiques, comme l'activité PTOX. Le qN a été calculé selon Kooten & Snel, (1990) par la formule :

$$qN = \frac{1 - (F'_m - F'_o)}{F_m - F_o}$$



### 3.3- Extraction de l'ARN total et PCR en temps réel

Les feuilles ont été broyées dans l'azote liquide avec un mortier et un pilon. L'ARN total a ensuite été extrait à l'aide du kit de purification d'ARN TRIzol Plus (Life Technologies Corporation). Après l'extraction, de l'ARN (50 µg) ont eu quelque contamination avec de l'ADN digéré avec le kit DNA-FreeTurbo (Invitrogen). L'ARN total (1 µg) a été chauffé à 65 ° C pendant 5 min, puis refroidi sur de la glace pendant 2 min. La transcription inverse a été réalisée en utilisant le kit de synthèse d'ADNciScript™ (Bio-Rad). Les réactions de PCR en temps réel ont été réalisées avec iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) et des amorces spécifiques pour chaque réaction cible dans un iCyclerIQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Des amorces ont été obtenus à partir de deux séquences de gènes extraites de la séquence genespace (ESG) de la base de données du niébé Initiative en génomique (CGKB) (Chen et al. 2007) et de la banque de gènes NCBI (tableau 1). Le gène de référence (*VuEF1α*) montrant la stabilité la plus élevée a été sélectionné à l'aide GeNorm (Vandesompele et al., 2002). Les données d'expression présentés dans les figures sont en moyenne entre 3 et biologique reproduit, à son tour, en moyenne de 3 répétitions techniques. PCR efficacité se situe entre 80% et 110%, selon les paires d'amorces et sur les valeurs CT pour chaque échantillon qui ont été acquis par iCycler IQ™ (Biorad).

Pour chaque gène, le niveau d'expression dans les échantillons traités (D, O et D + S) a été normalisée pour le niveau d'expression mesuré dans des échantillons témoins. L'expression du gène cible a été ensuite normalisée par rapport à l'expression du gène de référence tel que décrit dans la formule ci-après:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref}(control-sample)}}$$



où E est l'efficacité de la PCR, CT le seuil de cycle, cibler le gène cible, le gène de référence Ref, contrôler la CT de plantes témoins et des échantillons de la CT plantes stressées (Pfaffl, 2001). La carte de la chaleur et de graphiques montrent le rapport à une échelle  $\log_2$ . Logiciel Multi Viewer Experiment (MeV 4.8.1) a été utilisé pour établir les « heatmaps » et d'effectuer une analyse de classification hiérarchique (Saeed et al., 2003).

### **3.4- Extraction des protéines totales foliaires**

Pour préparer un extrait de protéines qui comprend notamment les protéines membranaires, les feuilles de niébé (1 g de masse de matière fraîche) ont été congelées dans de l'azote liquide et broyées en une poudre fine avec un pilon et un mortier refroidi. La poudre a été remise en suspension dans un tampon d'extraction de 5 ml (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) contenant 50 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 1  $\mu$ M de leupeptine, 1 pM de pepstatine. Après 30 min d'agitation (4 ° C) et de centrifugation (40.000 g pendant 20 min), le culot a été remis en suspension dans le même tampon contenant 1% de SDS. Après à nouveau 30 min d'agitation (4 ° C) et une centrifugation (40.000 g pendant 20 min), les protéines contenues dans le surnageant ont été précipitées (9.000 g pendant 10 minutes) avec de l'acétone (80% de concentration finale) et remises en suspension dans le même tampon avec du SDS 1% et stockés à -20 ° C (Joet et al., 2002). Après la remise en suspension des culots une aliquote a été utilisée pour mesurer la quantité de protéines totales avec le kit *DC protein assay* (Bio-Rad)



### 3.5- Western blotting

Les protéines membranaires de feuilles ont été dénaturées par ébullition dans 1% (p / v) de SDS et  $\beta$ -mercaptoéthanol à 100 ° C pendant 5 min, puis séparées par SDS-PAGE sur 13% (p / v) sur gels de polyacrylamide en utilisant un Mini Bio-Rad-Protean II (Bio-RadLaboratories, Ivry-sur-Seine, France) selon la méthode de Laemmli (1970). Après séparation par SDS-PAGE, les polypeptides ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec (Trans-Blot SD, Bio-Rad). La membrane a été traitée avec 3% de sérum albumine bovine pendant 3 heures, puis mis à réagir pendant une nuit avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'AOX (source : Center for Biotechnology, University of Nebraska-Lincoln). L'hybridation protéine-anticorps est visualisée avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase. Les immunocomplexes ont été détectés à l'aide du kit de chimiluminescence Western blot (Amersham Biosciences).





# RESULTATS



# PREMIER CHAPITRE



**4- LES RESPONSES PHYSIOLOGIQUES DE DEUX CULTIVARS  
DE *Vigna unguiculata* A LA SECHERESSE COMBINEE A  
L'EXPOSITION A L'OZONE**



## **Avant propos**

Ce chapitre se présente sous forme d'un article (en préparation pour soumission), dont l'objectif général est d'analyser les réponses de deux cultivars de *Vigna unguiculata* (L.) Walp à la sécheresse combinée à l'exposition à de fortes doses d'ozone. Les deux cultivars utilisés (EPACE et 1183) ont déjà été caractérisés par Torres-Franklin et al., (2007) en réponse à la sécheresse mais leur réponse vis-à-vis de l'ozone n'est pas connue. Parmi les plantes cultivées, le niébé est une fabacée importante dans le nord-est du Brésil, représentant la principale source d'approvisionnement alimentaire pour des nombreuses familles et aussi une importante source de gain économique (Araújo & Watt, 1988). Les expériences ont eu comme but d'évaluer la croissance et le développement des plantes de *Vigna unguiculata* soumis à travers l'analyse de la masse de matière fraîche des parties aériennes, la teneur relative en eau, en même temps que l'évaluation des paramètres biochimiques comme le MDA et le DAB. Des analyses de fluorescence de la chlorophylle ( $F_v/F_m$ ,  $P_{SII}$  et  $qN$ ) ont également été entreprises sur la première feuille trifoliée durant la période d'application des contraintes.





**Physiological responses of two *Vigna unguiculata* cultivars to combined drought stress and ozone exposure.**

Authors: Yuri Maia<sup>1,2,3</sup>, Deborah Moura Rebouças<sup>1,4</sup>, Matthieu Bagard<sup>4</sup>, José Hélio Costa<sup>1</sup>, Marie-Noëlle Vaultier<sup>2,3</sup>, Joelle Gerard<sup>2,3</sup>, Pierre Grandjean<sup>2,3</sup>, Pierre Dizengremel<sup>2,3</sup>, Anne Repellin<sup>4</sup>, Yves Jolivet<sup>2,3</sup> and Dirce Fernandes de Melo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Bioenergética, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Av. Mister Hull, s/n, CEP: 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup> Université de Lorraine, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, IFR110 EFABA, BP 70239, F-54506, Vandœuvre-Lès-Nancy, France

<sup>3</sup> INRA, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, IFR110 EFABA, F-54280, Champenoux, France.

<sup>4</sup> Université Paris Est Créteil, UMR 7618 Bioemco, 94010, Créteil, France

Key words

*Vigna unguiculata* (L.) Walp., drought, ozone, glutathione, ascorbate, physiological responses, antioxidant content.



## Introduction

Plants are frequently exposed to environmental stress and it is common that more than one abiotic stress occur at a given time, for instance, drought and exposure to high ozone doses. Abiotic stress limits crop productivity and plays a major role in determining the distribution of plant species across different types of environment. Thus, understanding the physiological processes that underlie stress injury and the tolerance mechanisms of plants to environmental stress is of crucial importance to both agriculture and environment. Abiotic stresses, especially drought, salinity and temperature, are the primary causes of plant loss worldwide (Vinocur & Altman, 2005). For the next decades these constraints are predicted to be amplified as a result of the climate changes and the subsequent increase in the greenhouse gases. Tropospheric ozone ( $O_3$ ) is both a greenhouse gas and an air pollutant with detrimental effect on the vegetation (Ashmore, 2005; Wittig et al, 2009). Recent data strongly indicates that  $O_3$  background levels in the troposphere are still increasing (Royal Society, 2008). Chronic  $O_3$  exposure may cause detrimental effects on both annual and perennial species, including visible leaf injury, reduction in biomass production, accelerated leaf senescence and altered sensitivity to other stresses (Pell, Schlaghauser, & Arteca, 1997; Renaut et al., 2009; Wittig, Ainsworth, Naidu, Karnosky, & Long, 2009). Drought could exacerbate the effect of the other stresses to which plants are submitted, particularly ozone stress (Matyssek et al. 2006; Morgan et al. 2003; Ibáñez et al. 2010). It is also well known that signal molecules as ethylene and ABA interact in case of drought and ozone stress to alter the responses of guard cells to drought alone (Wilkinson and Davies, 2010). The root system is the first organ to sense drought. After perception, a signal sent to the leaves triggers stomatal closure and shifts plant metabolism to a water-saving strategy. Many side effects could come from this strategy, which will ultimately leads to an overall increase in Reactive Oxygen Species (ROS) production (Cruz de



Carvalho 2008). In this condition, besides different cell tolerance mechanisms to face with water deprivation as the synthesis of osmotically active compounds, stimulation of antioxidant processes may occurred (Chaves, Maroco, & Pereira, 2003)

Highest O<sub>3</sub> concentrations usually occur around midday and during summer season (Lorenzini, Nali & Panicucci, 1994), in conjunction with high light and/or drought. Studies on combined effects of high light and O<sub>3</sub> in *Phaseolus vulgaris* indicated that the former exacerbated the detrimental effects of O<sub>3</sub> on photosynthesis (Guidi, Tonini & Soldatini, 2000). O<sub>3</sub>, for its part, enters in leaf by stomata, is rapidly transformed to ROS and triggers the detoxification processes (Dizengremel et al., 2008; Pell et al., 1997). Thus, the plants under stress condition are forced to balance ROS production/scavenging ratio and an imbalance in this ratio will induce cell damage (Mittler et al., 2011; Mittler et al., 2004). Based on the O<sub>3</sub> uptake models, drought induced stomatal closure would limit O<sub>3</sub> uptake into leaves and hence protect plants from O<sub>3</sub> stress (Grunehage & Jager, 2003, Panek & Goldstein, 2001, Panek, Kurpius & Goldstein, 2002). However, this simplistic model was challenged by observations that O<sub>3</sub> caused stomatal "sluggishness" that lead to incomplete stomatal closure and hence exacerbated the effects of drought (Gulke et al., 2005, Gulke et al., 2003, Karnosky et al., 2005).

The objective of the present paper was to clarify the differences between the responses of *Vigna unguiculata* (L.) Walp EPACE and 1183 cultivars under drought, O<sub>3</sub> and the combination of both. *Vigna unguiculata* is a leguminous plant known to be a drought-adapted culture. This crop is also important to support the production of livestock and cereals in semi-arid regions (Ehlers and Hall, 1997). In response to drought, different cultivars have been characterized according to their level of tolerance (Costa et al. 2007). EPACE is considered as a drought-tolerant cultivar, while 1183 is considered as a drought-sensitive one (Torres-Franklin et al. 2007). For this purpose *Vigna unguiculata* plants were submitted in phytotronic chamber to



watering withdraw combined or not to 120 ppb O<sub>3</sub> exposure. In addition to physiological parameters (RWC, stomatal conductance, chlorophyll fluorescence) we have measured the content of metabolites implied in detoxification processes (ascorbate and glutathione) as well as indicator of oxidative stress (MDA and TBARS) in order to evaluate whether and to what extent the two cultivars were able to be differentiated in these stress conditions.





## Material and Methods

### Plant Material, growth conditions and sampling procedure

*Vigna unguiculata* seeds of a rather drought-tolerant cultivar (EPACE) were obtained from the UFC Seeds Bank. The seed of the second cultivar, considered as a rather drought-sensitive (1183) were obtained from colleagues of the UMR BioEMCo, Paris-Est Creteil University. Seeds were surface sterilized with  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  0.5% for 5 min and rinsed in tap water before sowing into 5 L plastic pots containing compost (N/P/K 14/16/18, 1.2 kg.m<sup>-3</sup>, Gramoflor Repiquage) fertilized with 15 g of slow-release nutritive granules (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2; Fertil, Boulogne-Billancourt, France). The plants were grown for three weeks in growth chambers in strictly controlled conditions (14h days at an irradiance of 250  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  at the plant level, 25/20 °C, 80% humidity). All the plants were well irrigated with tap water kept at room temperature. After this period, the plants at the same developmental stage were transferred to phytotronic chambers (120 cm wide by 117 cm deep and 204 cm high) under the same conditions as previously described for a one-week as adaptation period. Plants were then submitted for more 14 days to the following conditions: O<sub>3</sub> fumigation (120 ppb  $\pm$ 10ppb) during 12 h daily, watering withdrawal (drought), and a combination of O<sub>3</sub> and drought simultaneously applied. In this way, a total set of 52 plants was distributed in eight fumigation chambers: 4 in a charcoal-filtered (CF) air and 4 in CF air enriched with O<sub>3</sub>. In each chamber half of the plants were submitted to watering withdraw while the others plants were regularly watered with tap water. In summary, 26 plants, were referred to as control plants (C), 26 plants were submitted to watering withdrawal (D), 26 plants were exposed to O<sub>3</sub> and kept well-watered (O), 26 plants were exposed to O<sub>3</sub> and deprived of water during the same time (D+O) as referred to the combination of the two stresses. The daily ozone fumigation period started 2 h after the beginning of the photoperiod and ran

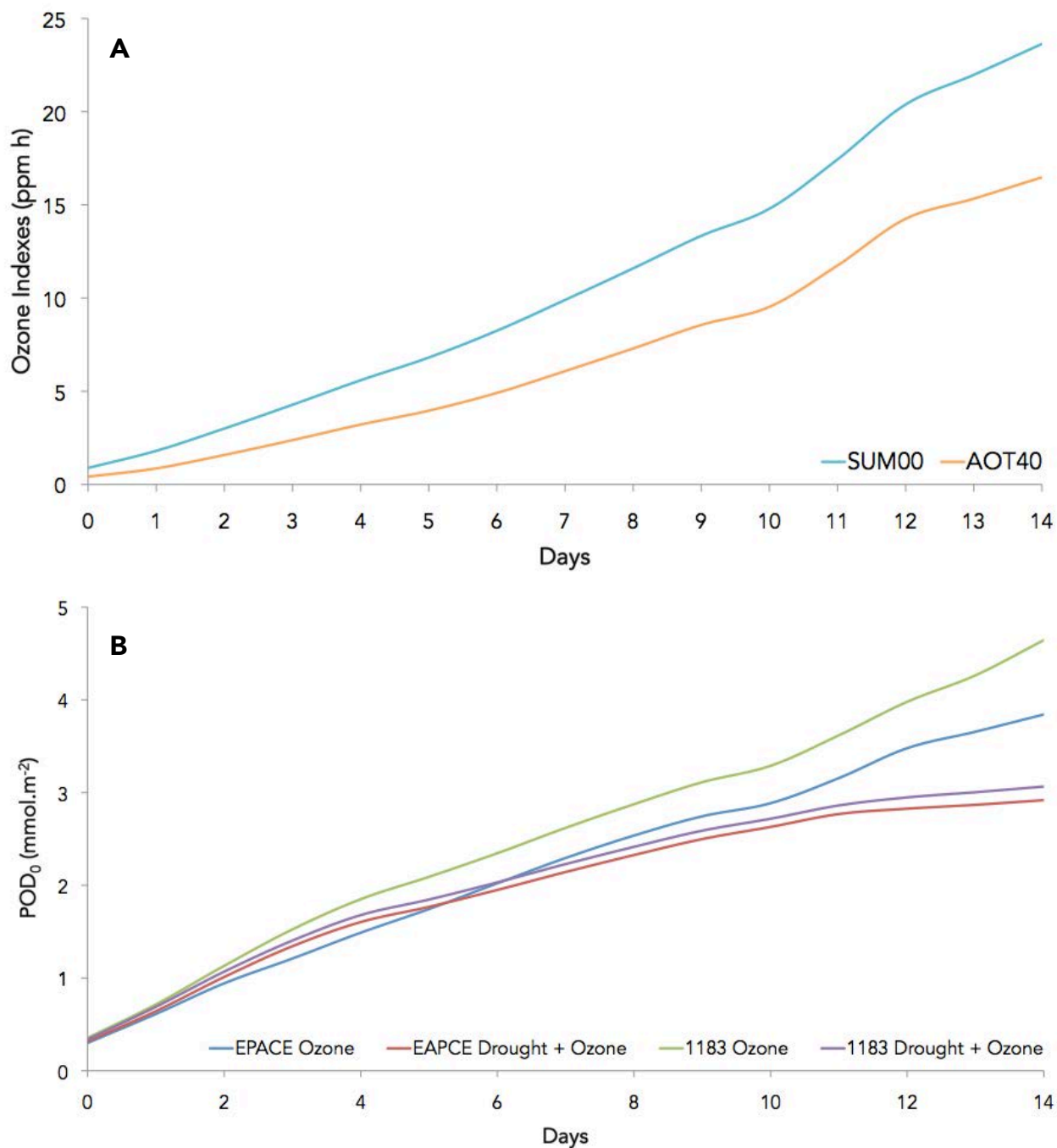


Figure 23. Evolution of the ozone exposure indices during the 14 days of treatment of *Vigna unguiculata* plants.  
 (A) Ozone exposure indices (AOT40 and SUM00, in ppm h)  
 (B) Ozone flux entering the leaves (POD<sub>0</sub>, in mmol.m<sup>-2</sup>)

until its end. O<sub>3</sub> was generated from pure O<sub>2</sub> using two O<sub>3</sub> generators (OZ500; Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) and continuously monitored by an O<sub>3</sub> analyzer (O341M; Environment S.A., Paris, France). Leaf samples were harvested on the first trifoliolate leaf, which was fully developed at the onset of the treatments. Leaf samples were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis.

### Ozone exposure indices

O<sub>3</sub> exposure and dose were evaluated using respectively the concentration-based index AOT40 (O<sub>3</sub> exposure accumulated over a concentration threshold of 40 ppb) and the flux-based index POD<sub>Y</sub> (Phytotoxic Ozone Dose over an instantaneous flux threshold of Y nmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Following the notation of Mills et al., (2011) the indices may be written as:

$$AOT40 = \sum_{i=1}^N \max(c_i - 40, 0) \Delta t$$

and

$$POD_Y = \sum_{i=1}^N \max(F_{st,i} - Y, 0) \Delta t$$

The calculation of AOT40 and POD<sub>0</sub> is based on hourly values of O<sub>3</sub> concentration (c<sub>i</sub> in ppb) or stomatal flux (F<sub>st,i</sub> in mmol.m<sup>-2</sup>), respectively. N refers to the number of hours to be included in the calculation period and Δt = 1 h. Only daylight hours were considered. The stomatal uptake of O<sub>3</sub> (F<sub>st</sub>) was calculated as described by Bagard et al. (2008).

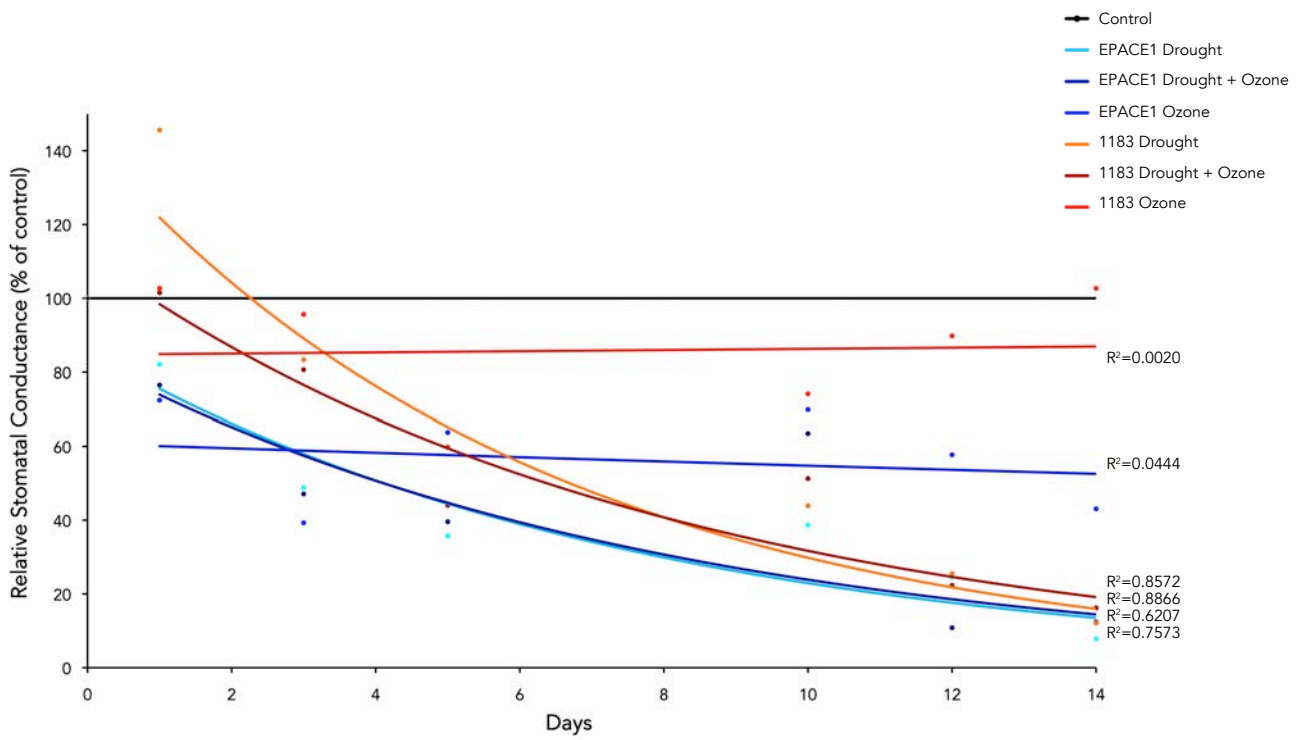


Figure 24. Relative stomatal conductance ( $g_s$ ) of leaves of *Vigna unguiculata* submitted to different treatments compared to the control.

### **Sampling procedure**

At the beginning of the fumigation period, the first trifoliolate leaves were already fully developed. Thus, the same leaves were monitored throughout the experiment. Leaf phenology is a decisive factor influencing O<sub>3</sub> sensitivity of plants. It is widely accepted that mature leaves are more sensitive to O<sub>3</sub> than younger, expanding ones (Bagard et al., 2008; Pääkkönen, Metsärinne, Holopainen, & Kärenlampi, 1996; Strohm et al., 1999).

### **Shoot weight, relative water content and stomatal conductance determination**

Shoots (trifoliolate leaves, petioles and stems) were collected at the end of the experiment and weighed to obtain the shoot fresh weight (SFW). The relative water content (RWC) was monitored at 3, 7 and 14 days after the stress application and it was calculated according to Weatherley (1950) [RWC% = (FW - DW) × 100/TW, where FW is the fresh weight; DW, dry weight and TW, turgid weight]. Turgid weight was obtained by placing the leaf discs (2 cm diameter) for 24h on filter paper imbibed with distilled water at 8°C. Stomatal responses (g<sub>s</sub>) were regularly monitored with a SC-1 leaf porometer (Decagon Devices, Pullman, WA).

### **DAB staining and MDA assay**

Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation was examined by using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining. DAB solution (1mg.mL<sup>-1</sup>) was vacuum infiltrated in 1 cm diameter leaf discs and let impregnated for 24h in the dark. After this time, leaf discs were discolored with three successive 95% ethanol washing and stored in glycerol 30%. Pictures were taken with a stereoscopic microscope under 0.8 x magnification (Nikon SMZ1000) coupled with a digital camera (Nikon D70S). The

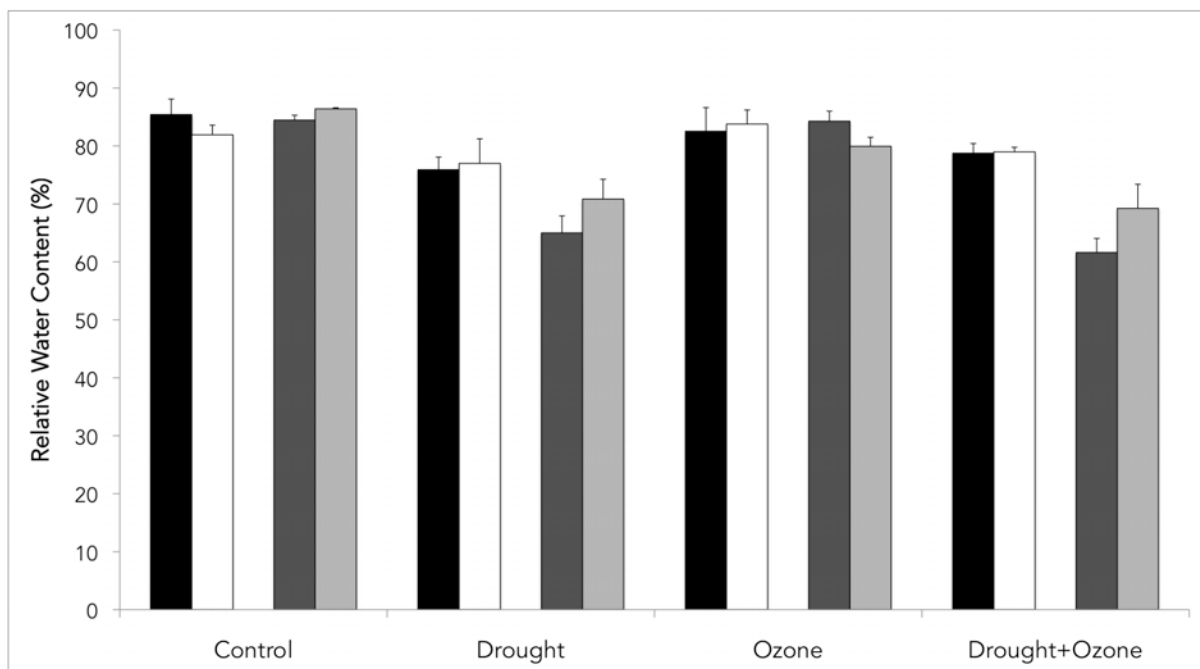


Figure 25. Relative water content of *Vigna unguiculata* plants exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bars) and 1183 14 days (light gray bars).

malondialdehyde (MDA) assay was performed according to Hodges et al. (1999).

### **Ascorbate and Glutathione Determination**

To determine ascorbate and glutathione content in leaf extracts, the protocol described by Queval & Noctor (2007) was followed with slight modifications. Leaf were harvested, ground in liquid nitrogen, and then ground in 1 mL of 1 M HClO<sub>4</sub>. After thawing, samples were centrifuged for 15 min at 15,000g and 4° C. The pH of the clarified supernatant was adjusted to 5.6 with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and insoluble KClO<sub>4</sub> was removed by centrifugation. Ascorbate and glutathione were measured in the same supernatant. Total ascorbate contents were measured as the ascorbate oxidase-dependent decrease in A<sub>265</sub> before (reduced ascorbate) and after (total ascorbate) treatment of the sample for 15 min with 0.1 M DTT. The 1-mL reaction mixture contained 0.12 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.6 and 0.1 mL of extract. The difference in A<sub>265</sub> before and after the addition of 1 unit of ascorbate oxidase was converted to ascorbate concentration (A<sub>265</sub> 12.6 mM 1 cm 1) (Dutilleul et al., 2003). Total glutathione contents were measured using the enzymatic recycling assay, which involves the NADPH-driven glutathione-dependent reduction of 5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid at 412 nm (Dutilleul et al., 2003).

### **Chlorophyll fluorescence measurement**

Modulated chlorophyll fluorescence emission from the upper surface of the leaf was measured with a Pulse Modulated Chlorophyll Fluorometer (FMS 1, Hansatech, Norfolk, UK). First of all, Fo and Fs (minimum fluorescence yield of dark- and light-adapted leaves, respectively), as well as, Fm and Fm' (maximum fluorescence yield of dark and light-adapted leaves, respectively) were obtained with the application of

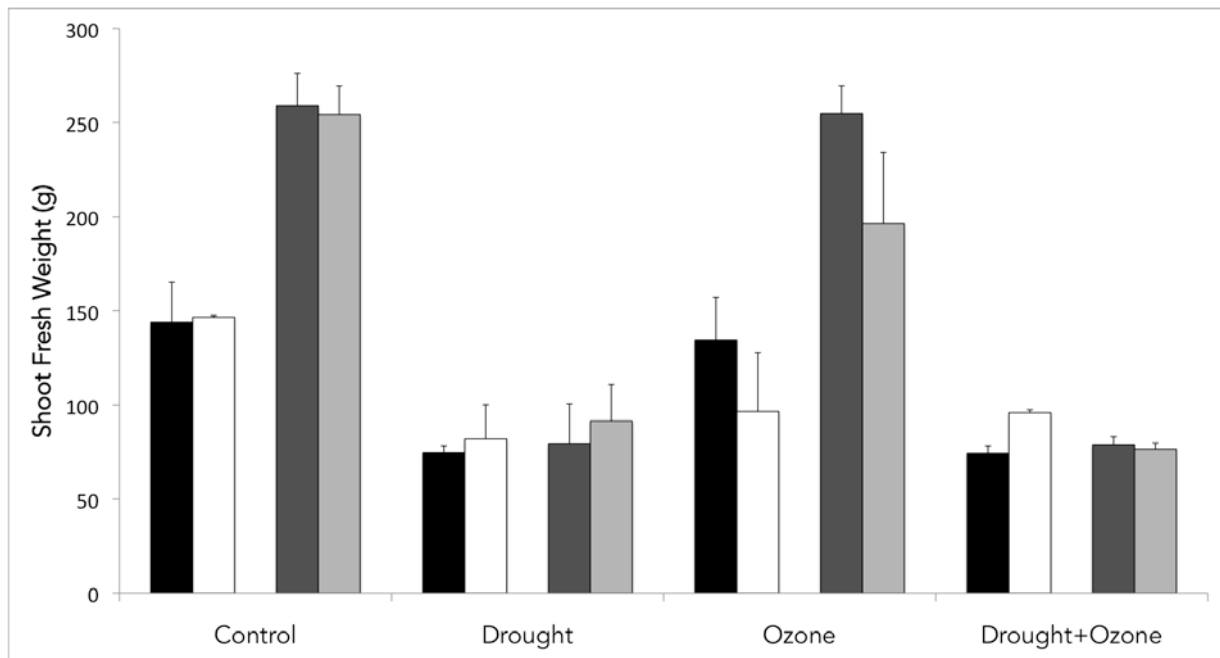


Figure 26: Shoot fresh weight of *Vigna unguiculata* plants exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bars) and 1183 14 days (light gray bars).



a saturating pulse. The ratio  $F_v/F_m$  and the effective quantum yield of PSII was calculated according to Genty et al. (1989). The non-photochemical quenching (qN) was calculated according to Kooten & Snel (1990)

### ***Statistical analysis***

For a given parameter at a given time point, the differences between treatments was tested through the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey or Student post-hoc tests ( $\alpha = .05$ ).

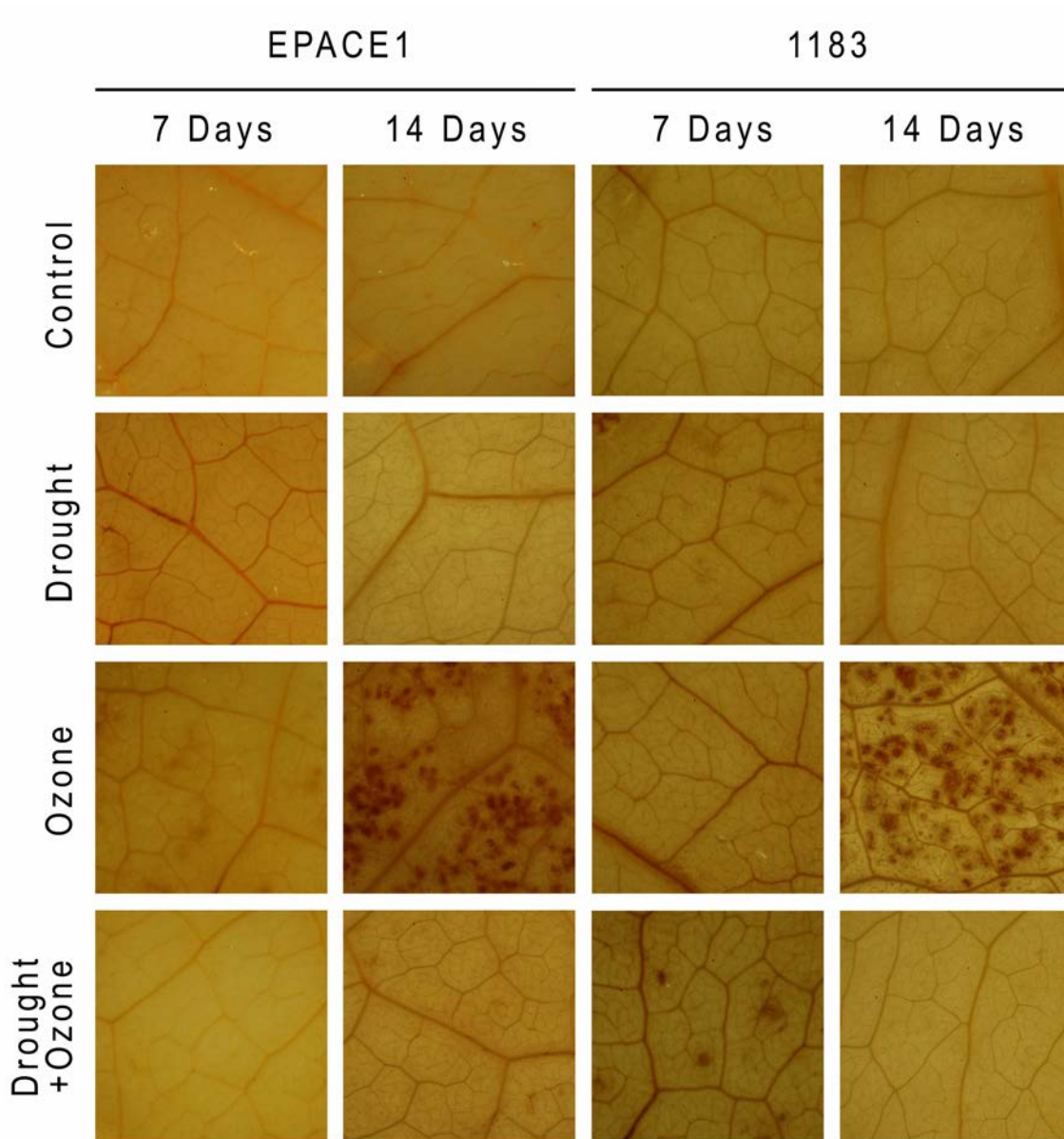


Figure 27. Detection of hydrogen peroxide using DAB staining of *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days.

Pictures are representative of three independent biological replicates. No specific staining was observed in control-treated leaves with ascorbic acid (data not shown). (DAB: 3,3'-diaminobenzidine)

## **Results**

### **Ozone indices**

Two ozone indices were used in this study. The first one, AOT40, is based on the external ozone concentration (exposure) while the second one, POD<sub>0</sub>, rather indicates absorbed dose through stomata. At the end of the fumigation period, the AOT40 index reached a maximum of 16.47 ppm h (figure 23A). To calculate the POD<sub>0</sub> index, it is necessary to take into account the stomatal conductance ( $g_s$ ). As a consequence of a higher stomata conductance, the POD<sub>0</sub> for 1183 reached a final value of 4.64 mmol.m<sup>-2</sup>, slightly higher than for EPACE (3.84 mmol.m<sup>-2</sup>). The value of POD<sub>0</sub> in D+O or O plants were not statistically different, however an important tendency to have lower POD<sub>0</sub> value with the combination of treatments occurred, particularly 14 days after the stress was applied (figure 23B). This tendency was seen for both cultivars as the result of a stomata closure due to the drought stress.

### **Stomatal conductance**

Firstly the stomatal conductance of the control plants was measured (data not shown), and the results showed that at days 1 and 3 the conductance was higher for EPACE (around 30% higher than 1183). For the other sampling dates, the difference of the stomatal conductance between the two cultivars was not significant. Lower values of conductance were noted from the day 5 until the end of the experiment. This drop in stomatal conductance could be attributed to the shade caused by the development of the upper leaves. The O<sub>3</sub> treatment alone (O) tended to diminish stomatal conductance, with a higher closure for the cultivar EPACE (figure 24). The plants subjected to water deprivation (D and D+O) progressively closed their stomata (figure 24). After 5 days the degree of opening reached 75 and 70% for

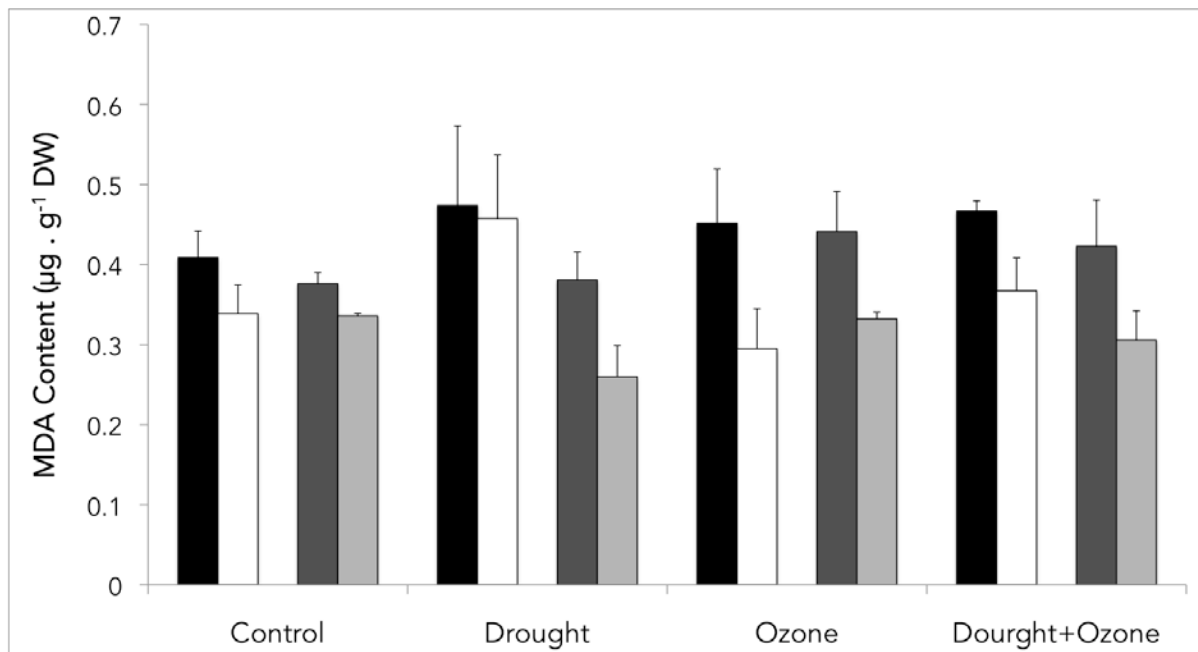


Figure 28. Malondialdehyde content in *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bars) and 1183 14 days (light gray bars).

1183 cultivar, under D and D+O respectively. On the other hand, EPACE showed a stomatal closure around 50% on the fifth day. After 14 days the discrepancy between the two cultivars became lower for plants subjected to drought (D) and to combined O<sub>3</sub> exposure and drought (D+O). The evolution of stomatal conductance under D+O followed almost the same profile as drought alone (D) for the EPACE cultivar. However for 1183, a tendency to a weaker stomata closure could be observed at the beginning of the combined treatment (until 5 days) for the D+O plants by comparison with D treatment. After 14 days the differences between D and D+O treatments have disappeared for this cultivar (figure 24). For EPACE, no difference was noted all along the stress period between D and D+O.

### **Water and growth parameters**

Relative water content (RWC) and shoot fresh weight (SFW) were determined on *Vigna unguiculata* plants throughout the experiment (figure 25). In response to O treatment, changes in RWC were not significant differently at day 7 and day 14 for the two cultivars. However, the RWC in 1183 leaves tended to be lower than EPACE at day 14 (figure 25). Changes in SFW were more pronounced for the 1183 cultivar under O<sub>3</sub> with a reduction of 25% at day 7 and 14 when compared to EPACE (figure 26). EPACE plants submitted to O<sub>3</sub> did not show any significant difference when compared to the control condition. The response of RWC and SFW in D and D+O plants did not differ. Under D and D+O the RWC was lower for EPACE when compared to 1183 at 14 days. A decrease in RWC values of 10% and 25% on day 7 and day 14 respectively, were noted for EPACE, while 1183 showed a reduction of 7% and 15% respectively (figure 25). The same profile was observed for SFW values. Indeed, for the two cultivars, drought combined or not with O<sub>3</sub>, diminished SFW by 40% and 70% on day 7 and day 14 respectively (figure 26). So drought stress alone

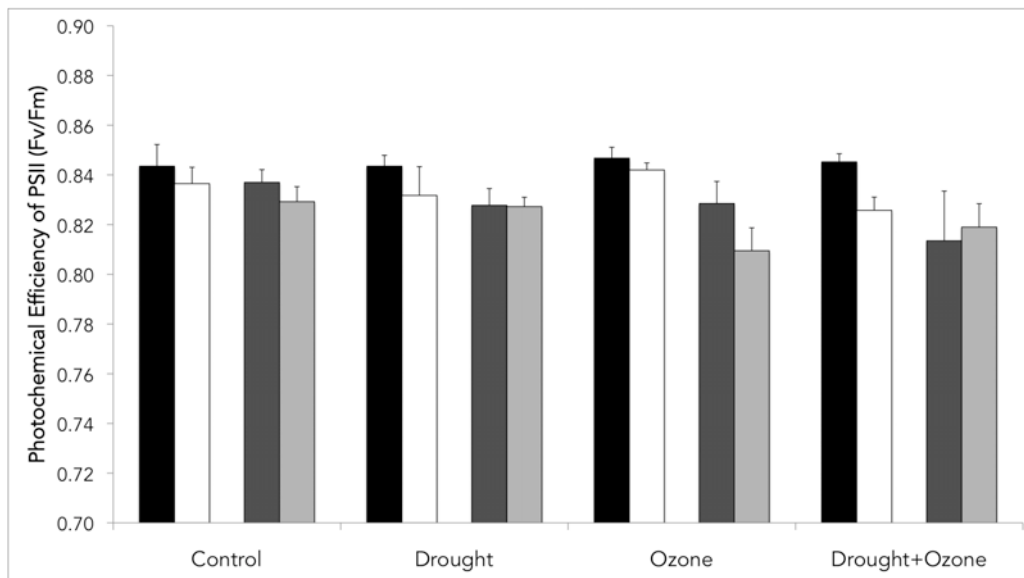


Figure 29. Photochemical efficiency of PSII of *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days.

The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bras) and 1183 14 days (light gray bars).

drastically impaired shoot development of the two cultivars and the O<sub>3</sub> treatment had only an effect on 1183 cultivar.

### **Symptoms of oxidative stress**

Leaf discs were stained with DAB to detect the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a marker of oxidative stress. At day 7, EPACE plants did not show any noticeable difference whatever the treatment applied (figure 27). Even the plants subjected to O<sub>3</sub> treatment alone showed a slightly diffuse reddish color. At day 14, only leaves of O<sub>3</sub>-treated plants showed distinct dark red spots (figure 27), whereas the cultivar 1183 showed a distinct profile. On day 7, only plants subjected to drought showed slightly stained spots symptoms, which were amplified under D+O treatment. On day 14, the plants of 1183 subjected to O<sub>3</sub> treatment showed a very strong presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, even more remarkable than for EPACE plants (figure 27). By contrast, no symptoms were detected on D and D+O plants. MDA levels were also analyzed to assess the level of lipid peroxydation as a marker of oxidative damage of the leaf tissues. The cultivar EPACE did not show any significant differences after 7 and 14 days, although stress-treated plants tended to show higher MDA contents (figure 28). For the 1183 cultivar, higher level of lipid peroxydation was established on day 7 and occurred in response to the drought treatment, but was no significant for D+O. This effect disappeared at day 14 (figure 28). MDA content were systematically higher for the EPACE cultivar when compared to 1183, except for the plants subjected to D on day 7, for which the content of MDA was the same for both cultivars.

### **Photosynthesis efficiency**

Fluorescence parameters were assessed to estimate the damage caused by the stresses to the photosynthetic apparatus. At day 7,  $F_v/F_m$  (the maximum quantum

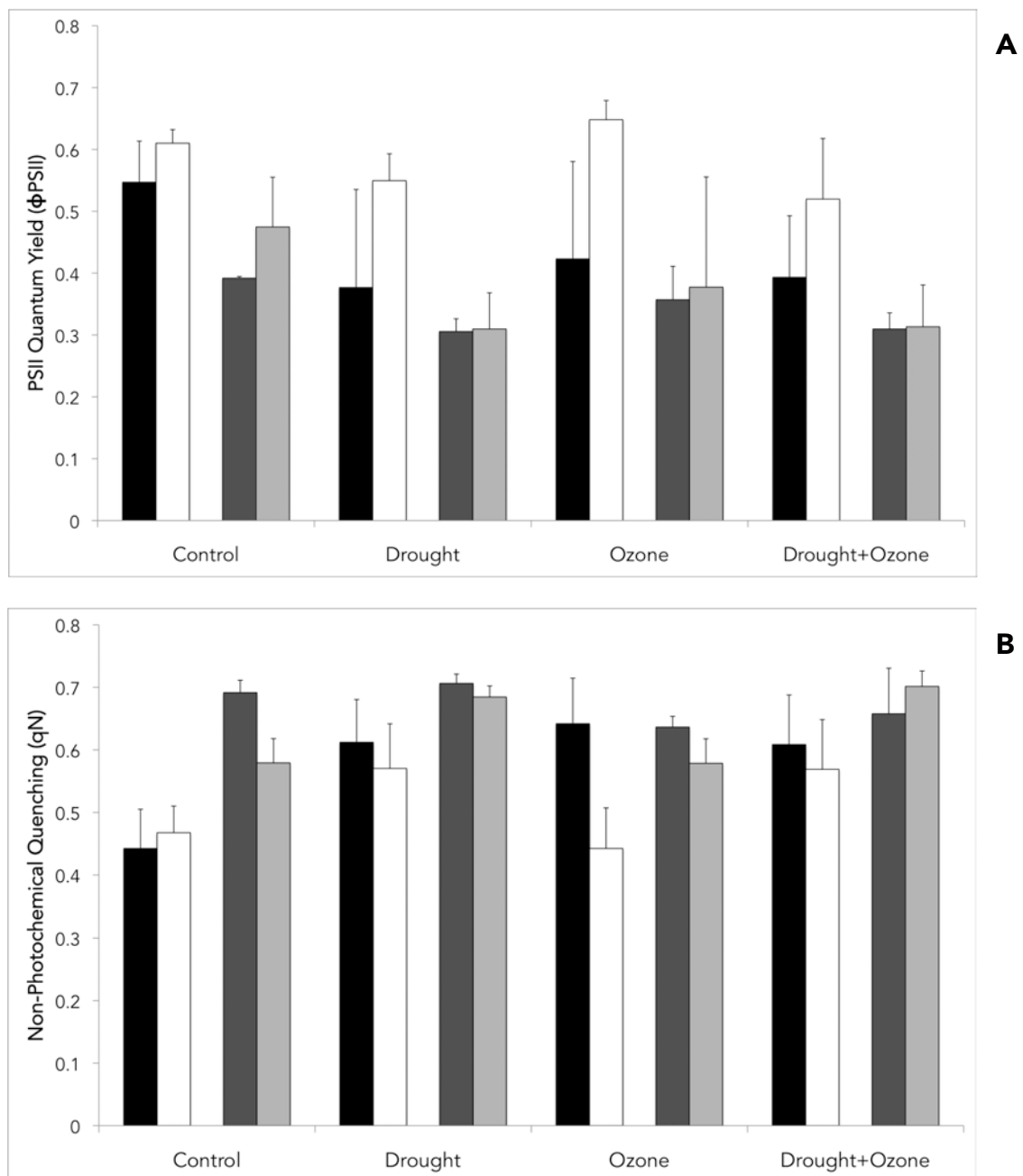


Figure 30. Photosynthesis efficiency of *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. (A) Effective PSII quantum yield ( $\phi_{PSII}$ ) and (B) non-photochemical quenching (qN). The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bars) and 1183 14 days (light gray bars).



efficiency of Photosystem II) was not strongly affected for the two cultivars (figure 29). Though, the  $F_v/F_m$  was lower to 1183 cultivar when the plants were submitted to D and D+O at 7 days when compared to EPACE. Under ozone this difference between the two cultivars was only observed after 14 days, always lower for the sensitive cultivar. At day 14, the responses differed according the cultivars. For EPACE,  $F_v/F_m$  significantly decreased for the D+O treatment (figure 29) when compared to control ones. The tendency was similar for 1183 but the inhibition was more pronounced in response to  $O_3$  treatment alone (figure 29). The PSII quantum yield ( $\phi_{PSII}$ ) decreased at the day 14 for the two cultivars (figure 30A), while no significant changes were noted at day 7. Nevertheless, 1183 plants showed systematically higher  $\phi_{PSII}$  values at day 14 when compared to EPACE. By contrast, changes concerning the qN seemed to be more pronounced at day 7 (figure 30B). At this time, an increase was noted for all the treatments for EPACE but 1183 cultivar showed lower values of qN (30%) when compared to EPACE. The 1183 cultivar showed more important variations only for the drought treatments (D and D+O) at 7 days (figure 30B).

### **Antioxidant metabolites**

To assess the detoxification network, content of ascorbate and glutathione in the leaves of treated plants was analyzed. The total ascorbate content of EPACE cultivar did not show any difference after 7 days of treatments (figure 31A). Ozone tended to decrease the ascorbate content for 1183 at day 7 and this effect was also present for D+O plants when compared to control. EPACE treated plants compared to control revealed, at day 14, a slight increase in response to D and D+O treatments, while ascorbate content decreased under ozone. For the cultivar 1183, ascorbate content increased at day 14 under D and D+O conditions and this effect already began for drought alone at day 7 (figure 31A). At 7 days, a reduction of the

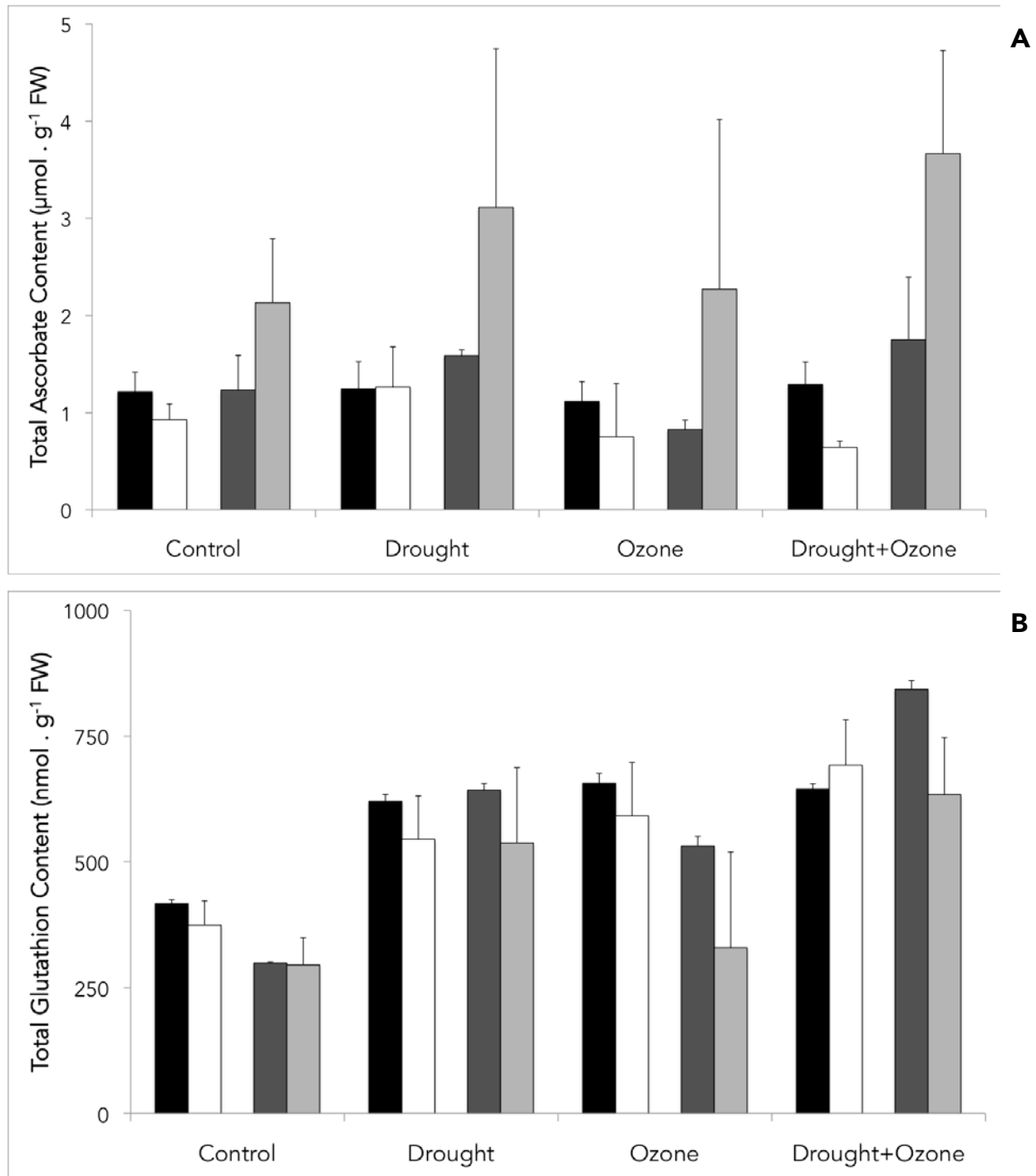


Figure 31. Antioxidant content measurements in *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days.

(A) Total ascorbate and (B) total glutathione content. The different experimental times and cultivars are referred as follow: Epace 7 days (black bars), 1183 7 days (white bars), Epace 14 days (dark gray bras) and 1183 14 days (light gray bars).

ascorbate content was perceived for 1183 plants under O and D+O treatments when compared to EPACE ones, and at 14 days the ascorbate content was systematically higher for 1183 plants, compared to EPACE. At 14 days, the 1183 ascorbate content values were 95, 175 and 110% higher when compare to EPACE under D, O and D+O, respectively (figure 31A). Concerning the glutathione profile, there was no drastic difference between the two cultivars, except for 1183 plants at 14 days subjected to O and D+O treatments, for which a reduction in glutathione content was perceived (figure 31B). Whatever the stress conditions, an increase at day 7 and day 14 was observed for EPACE (figure 31B). At day 14, the glutathione content reached a higher value under (D+O) treatment. For 1183 cultivar, the glutathione content also increased at day 7 whatever the treatments but at day 14 this effect did not occurred for O plants where glutathione content got back to control levels (figure 31B).



## **Discussion**

Nowadays, it is largely accepted that environmental constraints, including drought and ozone exposure, have an unfavorable impact on vegetation (Morgan et al. 2003; Ibáñez et al. 2010). The impact of O<sub>3</sub> exposure on vegetation has been well studied in the last two decades and these works unanimously underlined the fact that O<sub>3</sub> is an important environmental factor that could limit crop yield. Except for a few studies (Dafré-Martinelli et al. 2011; Alves et al. 2011), the effect of ozone on tropical species is still largely unknown, as is the critical ozone level for crops cultivated in tropical regions. A larger number of publications refer to drought for tropical crops, particularly for *Vigna unguiculata* (Ehlers & Hall, 1997). However the combination of drought with another abiotic constraint, particularly with ozone, is still scarcely studied. In this scenario, we investigated the responses of *Vigna unguiculata*, a tropical crop of northeast Brazil, in response to drought, elevated O<sub>3</sub> (120 ppb) and the combination of both, through physiological parameters.

In accordance with Mills et al., (2007) soybean, a *Fabaceae* closely related to *Vigna unguiculata*, is a moderately O<sub>3</sub> sensitive crop with a critical level of 4.3 ppm h O<sub>3</sub> for 5% yield reduction. In our work *Vigna* plants were submitted to a relatively high ozone exposure level that reached an AOT40 of 16 ppm h at the end of O<sub>3</sub> exposure (figure 23A), which is four times higher than the critical level for soybean. At this elevated O<sub>3</sub> exposure level, the growth of *Vigna unguiculata* differed according the experimented cultivar. For EPACE, no significant difference between O<sub>3</sub>-treated and control plants were observed in terms of growth, water content and photosynthesis. Conversely, cv 1183 displayed a decrease in the SFW under ozone exposure, when compared to the control plants. The different behavior of these cultivars could be partly explained by a difference of stomata conductance with a tendency for EPACE to close its stomata and reduced the amount of absorbed ozone (see POD<sub>0</sub>) (figure



23B). A lower stomatal conductance for tolerant genotype has been already described in poplar (Di Baccio et al, 2008) in response to ozone. Another explanation could be in the difference of antioxidant cell capacity. Divergent results have been published to link higher ascorbate content with a higher tolerance to ozone. Thus in *Plantago* (Zheng et al, 2000) and snap bean (Burkey et al., 2000), leaf ascorbate was identified as a potential factor in ozone tolerance. By contrast, apoplastic or symplastic ascorbate did not contribute to ozone tolerance in white clover clones (D'Haese, Vandermeiren, Asard, & Horemans, 2005). Our results also seem to rule out such relation between ascorbate and ozone tolerance with higher amounts of ascorbate in the sensitive cultivar (1183) at the end of the O<sub>3</sub> treatment. By contrast, in response to O<sub>3</sub> treatment, the glutathione content had been increased and kept at this level in EPACE while in 1183 it reached again the control value at the end of the O<sub>3</sub> treatment. Apparently, the glutathione content could be related to the tolerance of cv EPACE to ozone. However, D'Haese et al (2005) showed that two differing cultivars of *Trifolium repens* (one O<sub>3</sub>-tolerant and the other O<sub>3</sub>-sensitive) did not differ in the glutathione content. Further evidence is needed in order to determine if the higher GSH content, as well as its redox status is determinant of O<sub>3</sub> tolerance.

Leaf phenology is a decisive factor that influences ozone sensitivity in plants. It is widely accepted that mature leaves are more sensitive to ozone than younger, expanding ones (Pääkkönen et al. 1996; Strohm et al. 1999; Bagard et al. 2008). Therefore, working with the first trifoliate leaf, which was completely developed at the beginning of the treatments, allowed us to observe ozone injuries. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation was detected in the leaves of O<sub>3</sub>-treated plants after 7 days and to a greater extent after 14 days treatment for both cultivars, yet 1183 showed again to be more affected by the ozone exposure regarding the greater extent of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection on the leaves of this cultivar (figure 27). The higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level in O<sub>3</sub>-exposed plants could be explained by the instability of ozone and its decomposition





within leaf tissues, which leads to the formation of reactive oxygen species (ROS) such as  $H_2O_2$  (Kangasjärvi et al. 1994). In our experiment, ozone also accelerated leaf damage, abscission and senescence (data not show), as mentioned in previous works (Pell et al. 1997; Wittig et al. 2007). We also noted that at the end of the  $O_3$ -exposure period (14 days) a decrease of  $F_v/F_m$  and of  $\Phi_{PSII}$  under ozone was more pronounced for 1183. All these results reinforce that under ozone the 1183 cultivar is more sensitive than EPACE.

Drought stress is known to be one of the most severe stresses to the plants and most of the damage caused by drought is linked to ROS formation. There are many studies that report on increased ROS accumulation and oxidative stress under drought. In fact, under drought, ROS production is enhanced through multiple ways (Dat et al., 2000; Mittler, 2002). For instance, the limitation on  $CO_2$  fixation will reduce  $NADP^+$  regeneration through the Calvin cycle, hence involving an over reduction of the photosynthetic electron transport chain. In our experiment, drought treatment alone affected the relative water content and the shoot fresh weight of both cultivars in the same extent. However, stomatal conductance was slightly differently affected. While the tolerant cultivar (EPACE) showed a more immediate response with a more strong stomatal closure very early, the sensible one (1183) showed a retarded response. However if the sensitive cultivar showed a higher value of stomatal conductance, some growth parameters (SFW & RWC) did not show any difference from the tolerant cultivar (figures 25 and 26). Another, parameter that indicates the difference between the two cultivars is the DAB staining. For plant subjected to drought alone, 1183 plants showed diffused stains after 7 days, and the MDA levels were significantly higher for the D plants at 7 days too. The tolerant cultivar did not show any of these signs. The stomatal closure is frequently suggested as the more important sign of drought symptoms, their closure favors the decrease of water loss, but on the other hand it leads to an impairment of the Calvin cycle and ultimately photo-oxidative damages to the unbalanced light and dark



reactions. Nevertheless, 1183 showed more signs of oxidative damage, than EPACE. Therefore the more important factor to avoid drought-induced oxidative damage is a highly balanced ROS scavenging system. In this regards, the tolerant cultivar, showed no significant differences in the total ascorbate content under drought while the glutathione content was increased since 7 days of stress and this increase was higher on the 14<sup>th</sup> days. Concerning 1183, a different profile was observed for, the ascorbate content which increased since 7 days and continued on the 14<sup>th</sup> day. For the glutathione the same profile as EPACE was observed. Anyhow the higher ascorbate content of did not spare 1183 of the oxidative damage. The increase of the glutathione content in both cultivars could indicate a particular role of glutathione metabolism in response to drought. These changes are not necessary linked to Halliwell-Asada cycle regulation if we considered that glutathione reductase activity was not modified in response to drought (Torres-Franklin et al , 2008). However, GSH is the reducing co-susbtrate for many enzymes involved in ROS detoxification, thus playing a central role as an antioxidant (Noctor et al., 2012). Drought and the combination of drought and ozone, resulted in down-regulation of the photosynthetic linear electron transport in the leaves of EPACE and 1183 cultivars, and an increase in the non-photochemical quenching of fluorescence, which could correspond to heat dissipation in the antenna system (Müller et al., 2001). However, the decrease of  $F_v/F_m$  at the end of the stress period in both plant cultivars was very small, suggesting that chloroplasts are protected by mechanisms that dissipate excess excitation energy to prevent damage to the photosynthetic apparatus under adverse conditions (Ibáñez et al., 2010). These results of chlorophyll fluorescence reinforce the assumption that at least under drought and the combination of stresses, a non-photochemical quenching would prevent damages to the photosynthetic apparatus (Ibáñez et al., 2010). Nonetheless, the plants of the 1183 cultivar subjected to drought and the combination of stresses showed some diffuse spots of  $H_2O_2$  content after 7 days. This could be attributed to the difference



of tolerance to drought of the two cultivars. MDA formation resulting from the reaction of ROS with polyunsaturated lipids (Bielski et al. 1982) was perceptible only for the cultivar 1183 after 7 days under drought treatment.

Despite the fact that the two cultivars here studied did not show great differences when subjected to drought alone, it seems that they display different degrees of ozone tolerance. A rather important suggestion of this work is that the combination of the constraints seems to reduce the oxidative damage of ozone on the tissues when compared to O<sub>3</sub> exposition alone. Another important feature for ozone tolerance seems to be the differences of glutathione content on the two cultivars, since the tolerant cultivar showed higher accumulation of glutathione on the leaf tissues when exposed to O<sub>3</sub> and the combination of the two studied constraints lead to an even higher glutathione accumulation.



# DEUXIEME CHAPITRE





**5- PARTICIPATION DES PROTEINES DECOUPLANTES  
MITOCHONDRIALES (AOX ET PUCP) ET DE L'OXYDASE  
TERMINALE PLASTIDIALE (PTOX) DANS LA REPONSE DE  
*Vigna unguiculata* A LA SECHERESSE COMBINEE A  
L'EXPOSITION A L'OZONE**



**Avant propos**

Ce chapitre se présente sous forme d'un article (soumis) dont l'objectif général est d'analyser les réponses de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cv. EPACE) à la sécheresse combinée à l'exposition à de fortes doses d'ozone, en relation avec le métabolisme énergétique. Jusqu'à présent, aucune étude n'a examiné simultanément la régulation de ces protéines découplantes (AOX, PUCP, PTOX) dans des conditions de stress. L'objectif du présent travail est de contribuer à démêler la régulation de ces trois protéines en réponse à la sécheresse et/ou à l'ozone, deux contraintes connues pour engendrer un stress oxydant. *Vigna unguiculata* est une légumineuse économiquement importante dans les régions semi-arides, en particulier dans la région Nordeste du Brésil (Ehlers & Hall, 1997). En réponse à la sécheresse, des cultivars ont été caractérisés en fonction de leur niveau de tolérance (Costa et al., 2007). EPACE est considéré comme un cultivar tolérant à la sécheresse (Torres-Franklin et al., 2007). Dans notre expérimentation, les plants de *Vigna unguiculata* ont été soumis à un arrêt d'arrosage associé ou non à une exposition à l'ozone (120 ppb) dans des chambres phytotroniques. L'expression des gènes AOX, PUCP et PTOX a été étudiée par analyse de PCR en temps réel (qPCR). Le génome nucléaire de *Vigna unguiculata* comporte trois gènes codant pour l'AOX (*VuAOX1*, *VuAOX2a* et *VuAOX2b*) et six gènes codant pour la pUCP (*VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4*, *VuUCP5*). D'autre part, un seul gène PTOX, codée par le génome nucléaire, a été trouvé chez les plantes supérieures. En outre, des paramètres physiologiques (RWC, conductance stomatique, fluorescence de la chlorophylle) et biochimiques (MDA et de TBARS) ont été mesurés afin d'évaluer dans quelle mesure les plantes ont été affectées par les traitements.

A la fin de ce chapitre se trouve également placés les résultats préliminaires obtenus sur la quantification de l'AOX dans les feuilles de *Vigna unguiculata* pour dans les différentes conditions de stress. Compte tenu de la nécessité de conforter



ces résultats par d'autres analyses, ils ne sont pas présentés dans la publication qui a été soumise. Mais ces résultats préliminaires viennent toutefois conforter les conclusions que l'on a pu tirer des analyses d'expression et à ce titre mérite d'être présentés dans ce manuscrit.



**Involvement of plastid terminal oxidase (PTOX) and mitochondrial uncoupling proteins (AOX and pUCP) in the response of *Vigna unguiculata* to combined drought stress and ozone exposure.**

Authors: Yuri Maia<sup>1,2,3</sup>, Matthieu Bagard<sup>4</sup>, José Hélio Costa<sup>1</sup>, Marie-Noëlle Vaultier<sup>2,3</sup>, Deborah Moura Rebouças<sup>1,4</sup>, Pierre Grandjean<sup>2,3</sup>, Pierre Dizengremel<sup>2,3</sup>, Anne Repellin, Dirce Fernandes de Melo<sup>1</sup> and Yves Jolivet<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Bioenergética, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Av. Mister Hull, s/n, CEP: 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup> Université de Lorraine, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, IFR110 EFABA, BP 70239, F-54506, Vandœuvre-Lès-Nancy, France

<sup>3</sup> INRA, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, IFR110 EFABA, F-54280, Champenoux, France.

<sup>4</sup> Université Paris Est Créteil, UMR 7618 Bioemco, 94010, Créteil, France

Key words

*Vigna unguiculata* (L.) Walp., drought, ozone, alternative oxidase, uncoupling protein, mitochondria, plastid, gene expression





## Introduction

Abiotic stresses, especially drought, salinity and temperature, are the primary causes of plant loss worldwide (Vinocur and Altman 2005). For the next decades these constraints are predicted to increase as a result of climate changes and of the subsequent increase in greenhouse gas production. Tropospheric ozone ( $O_3$ ) is both a greenhouse gas and an air pollutant with detrimental effects on vegetation (Ashmore 2005). Recent papers undoubtedly indicate that  $O_3$  background levels in the troposphere are still increasing (Royal Society, 2008). Chronic  $O_3$  exposure can have detrimental effects on both annual and perennial species, including visible leaf injury, reduction in biomass production, accelerated leaf senescence and altered sensitivity to other stresses (Pell et al. 1997; Wittig et al. 2009; Renaut et al. 2009). Drought could intensify the effects of the other stresses plants are submitted to, particularly in combination with  $O_3$  (Matyssek et al. 2006; Morgan et al. 2003; Ibáñez et al. 2010). The root system is the first organ to sense drought. After perception, a signal sent to the leaves triggers stomatal closure and shifts plant metabolism to a water-saving strategy. This strategy can have many side effects which ultimately lead to an overall increase in Reactive Oxygen Species (ROS) production (Cruz de Carvalho 2008). As for ozone, it enters the leaves through stomata, is rapidly transformed into ROS and triggers detoxification processes (Pell et al. 1997; Dizengremel et al. 2008). Thus, plants under stress conditions are forced to balance ROS production/scavenging, and an imbalance of that ratio induces cell damage (Mittler et al., 2011). Besides being essential for cellular energy metabolism, chloroplasts and mitochondria are considered as the primary sites of ROS generation, since their intrinsic activity is to handle oxygen, as a donor or an acceptor of electrons. They are also target organelles that could function as redox sensors through their capacity to detect cellular energy imbalances. Therefore, under conditions of supraoptimal light or suboptimal  $CO_2$ , photoinhibition of



photosynthesis occurs, leading to overexcitation of chloroplast membranes, damage to photosystem II (PSII) and sometimes photosystem I (PSI) (Vass 2011). Mitochondria can dissipate redox equivalents from chloroplasts through the malate/oxaloacetate shuttle and the photorespiratory pathway and thereby avoid damage to thylakoid membranes, using a non-phosphorylating alternative pathway (AOX), as well as uncoupling proteins (Raghavendra and Padmasree 2003; Sweetlove et al. 2006; Pastore et al. 2007). AOX might redirect carbon metabolism through the control of intracellular concentrations of key respiratory intermediates (Vanlerberghe and McIntosh 1997). Additionally, plant mitochondria harbor an uncoupling protein called pUCP. pUCP was at first thought to be specifically found in animal mitochondria and was only observed in plant mitochondria in 1995 (Vercesi et al. 1995). It can dissipate the electrochemical proton gradient in the presence of fatty acids. A plastidial counterpart of AOX, the plastid terminal oxidase (PTOX) was discovered in 1999 (Carol et al. 1999). Because of its homology with AOX, PTOX is also suggested to shunt the classical electron chain in chloroplasts, which could prevent over-reduction of photosystems by keeping a well-oxidized pool of plastoquinones (McDonald et al. 2011). Consistently, *Arabidopsis* PTOX knockout mutants had their activity restored by AOX substitution (Fu et al. 2012). Nevertheless, the role of PTOX in the prevention of ROS formation is still debated (Stepien and Johnson 2009) and the ways PTOX activity could lower the rate of ROS formation under oxidative stress remain to be determined. Anyhow, recent studies show that PTOX, as well as the alternative plastidial pathway called chlororespiration, are induced under abiotic stresses such as high light, heat and drought (Ibáñez et al. 2010; Sun and Wen 2011).

Up to now, no studies have simultaneously investigated the regulation of these uncoupling proteins (AOX, pUCP, PTOX) in stress conditions. The objective of the present paper is to unravel their regulation under drought, ozone and the



combination of both in *Vigna unguiculata* (L.) Walp EPACE cultivar. *Vigna unguiculata* is a leguminous plant important to support the production of livestock and cereals in semi-arid regions, particularly in the Northeast region of Brazil (Ehlers and Hall, 1997). In response to drought, different cultivars have been characterized according to their level of tolerance (Costa et al. 2007). EPACE is considered as a drought-tolerant cultivar (Torres-Franklin et al. 2007). For this purpose *Vigna unguiculata* plants were submitted to watering withdrawal combined or not to 120 ppb O<sub>3</sub> exposure in phytotronic chambers. Expression of AOX, pUCP and PTOX genes was investigated by qPCR analysis. The nuclear genome of *Vigna unguiculata* carries three genes encoding AOX proteins (*VuAOX1*, *VuAOX2a* and *VuAOX2b*) and six genes encoding pUCP proteins (*VuUCP1a*, *VuUCP1b*, *VuUCP2*, *VuUCP3*, *VuUCP4*, *VuUCP5*). On the other hand, only one PTOX gene, encoded by the nuclear genome, has been found in higher plants. *VuAOX1* and *2b* are differentially regulated under a wide range of abiotic stresses (Costa et al. 2010), and so is *VuUCP1b* (Garantizado et al. 2011). In addition, physiological (RWC, stomatal conductance, chlorophyll fluorescence) and biochemical (MDA and TBARS) parameters were measured in order to evaluate whether or not and to what extent the plants were affected by the treatments.

Table 1. Primer pairs designed for real-time PCR.

	Forward		Reverse		
<i>VuAOX1</i>	5'	AAGATGGAGAAGAAGTTGGT	3'	5' TGTATGTCTCCCATGGCCTA	3'
<i>VuAOX2a</i>	5'	CTTCTGATATCCACTTTCAAGGT	3'	5' GGTGTCATGGTAAAGGACTG	3'
<i>VuAOX2b</i>	5'	CTTCAAGGAACGGTATGGG	3'	5' AGAGTGCTGAAACTTCCTC	3'
<i>VuUCP1a</i>	5'	AGCTGGTGATGTAATATCCG	3'	5' CCCAATTCTCAAACCTCCG	3'
<i>VuUCP1b</i>	5'	AAACAGCCTGTGATTGGTGAC	3'	5' CCATTACACATTGACGTTGTAG	3'
<i>VuUCP2</i>	5'	TCTGGACACAGCTAAGGCC	3'	5' TTCCACAGAGCTGATATACCC	3'
<i>VuUCP3</i>	5'	GTTGGGTATGAGCATCTGAG	3'	5' AGGGCTGGCTATAATCTGAG	3'
<i>VuUCP4</i>	5'	TGGATTGTGCTCTGAAGACG	3'	5' CCTTAAGCAACTTGCGAACC	3'
<i>VuUCP5</i>	5'	TTCTGTTGCATCGAATCCT	3'	5' CTTATAAAGGGCAAGAGGT	3'
<i>VuPTOX</i>	5'	TCCAAATCATCTCCACTTCAC	3'	5' CTTTATCACAGAATCCGTGAG	3'
<i>VuEF1<math>\alpha</math></i>	5'	GTAACAAGATGGATGCCACC	3'	5' CCACTTCTTCAAATACGAGGAG	3'

## Materials and Methods

### Plant Material, growth conditions and sampling procedure

*Vigna unguiculata* seeds of a drought-tolerant cultivar were obtained from the UFC Seeds Bank (cv. EPACE). They were surface-sterilized with  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  0.5% for 5 min and rinsed in tap water before sowing into 5-L plastic pots containing compost (N/P/K 14/16/18,  $1.2 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , Gramoflor Repiquage) fertilized with 15 g of slow-release nutritive granules (Nutricote T-100, N/P/K/MgO 13/13/13/2; Fertil, Boulogne-Billancourt, France). The plants were grown for three weeks in growth chambers in strictly controlled conditions (14 hrs light with photon irradiance of  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  at the plant level / 10 hrs dark, 25/20°C, 80% humidity). During that period, all the plants were well irrigated with tap water kept at room temperature. After that period, the plants at the same developmental stage were transferred to phytotronic chambers (120 cm wide, 117 cm deep, 204 cm high) under the same conditions as previously described for a one-week acclimation period. The plants were then submitted for 14 more days to the following conditions:  $\text{O}_3$  fumigation (120 ppb  $\pm$ 10ppb) for 12 hrs daily, watering withdrawal (drought), and a combination of  $\text{O}_3$  and drought applied simultaneously. A total set of 52 plants was distributed into eight fumigation chambers: 4 with charcoal-filtered (CF) air and 4 with CF air enriched with  $\text{O}_3$ . In each chamber, half of the plants were submitted to watering withdrawal while the other plants were regularly watered with tap water. To sum up, 13 plants were referred to as control plants (C), 13 plants were submitted to watering withdrawal (D), 13 plants were exposed to  $\text{O}_3$  and kept well-watered (O), 13 plants were exposed to  $\text{O}_3$  and deprived of water for the same time period (D+O), referred to as the combination of the two stresses. The daily ozone fumigation period started 2 hrs after the beginning of the photoperiod and ran until its end. Ozone was generated from pure  $\text{O}_2$  using two ozone generators (OZ500;

Table 2. Indices of ozone exposure (AOT40, in ppm h) and stomatal uptake (POD<sub>0</sub>, in mmol.m<sup>-2</sup>) and relative stomatal conductance ( $g_s$ , in percent of the control) 3, 7 and 14 days after the beginning of the experiment. *Vigna unguiculata* plants (cv Epace) were exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments. Letters refer to homogenous subsets given by the ANOVA and Tukey's post hoc tests performed at a given time point. Treatments that share a letter were not statistically different ( $n = 4$ ;  $\alpha = .05$ ).

	3 days			7 days			14 days		
	AOT40	$g_s$	POD <sub>0</sub>	AOT40	$g_s$	POD <sub>0</sub>	AOT40	$g_s$	POD <sub>0</sub>
Control	-	100	-	-	100	-	-	100	-
Drought	-	60	-	-	40	-	-	20	-
Ozone	2.37	60	1.21±0.12 <sup>a</sup>	6.07	60	2.29±0.48 <sup>a</sup>	16,47	60	3.84±0.59 <sup>a</sup>
Drought+Ozone	2.37	60	1.34±0.49 <sup>a</sup>	6.07	40	2.14±0.46 <sup>a</sup>	16,47	20	2.92±0.45 <sup>a</sup>



Fischer, Bonn, Germany and CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Germany) and continuously monitored by an O<sub>3</sub> analyzer (O341M; Environment S.A., Paris, France). Leaf samples were harvested on the first trifoliate leaf, which was fully developed at the beginning of the treatments. Leaf samples were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis.

### Ozone exposure indices

Ozone exposure and dose were evaluated using respectively the concentration-based index AOT40 (ozone exposure accumulated above a concentration threshold of 40 ppb) and the flux-based index POD<sub>Y</sub> (Phytotoxic Ozone Dose over an instantaneous flux threshold of Y nmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Following the notation of Mills et al., (2011) the indices may be written as:

$$AOT40 = \sum_{i=1}^N \max(c_i - 40, 0) \Delta t$$

and

$$POD_Y = \sum_{i=1}^N \max(F_{st,i} - Y, 0) \Delta t$$

The calculation of AOT40 and POD<sub>0</sub> is based on hourly values of ozone concentrations ( $c_i$  in ppb) or stomatal fluxes ( $F_{st,i}$  in mmol.m<sup>-2</sup>), respectively.  $N$  refers to the number of hours to be included in the calculation period and  $\Delta t = 1$  hr. Only daylight hours were considered. Stomatal ozone uptake ( $F_{st}$ ) was calculated as described by Bagard et al. (2008).



### **Shoot weight, relative water content and stomatal conductance**

Shoots (trifoliate leaves, petioles and stems) were collected at the end of the experiment and weighed to obtain shoot fresh weight (SFW) values. The relative water content (RWC) was monitored 3, 7 and 14 days after the stresses were applied and it was calculated according to Weatherley (1950) [RWC% =  $(FW - DW) \times 100/TW$ , where FW is fresh weight; DW, dry weight and TW, turgid weight]. Turgid weight was obtained by placing 2-cm diameter leaf discs for 24hrs at 8°C on filter paper imbibed with distilled water. Stomatal responses ( $g_s$ ) were regularly monitored with an SC-1 leaf porometer (Decagon Devices, Pullman, WA).

### **DAB staining and MDA assay**

Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) accumulation was investigated using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining. DAB solution ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) was vacuum-infiltrated into 1-cm diameter leaf discs and the disks were left to impregnate for 24 hrs in the dark. After that, leaf discs were discolored in three successive 95% ethanol baths and stored in glycerol 30%. Pictures were taken with a stereoscopic microscope under 0.8 x magnification (Nikon SMZ1000) coupled with a digital camera (Nikon D70S). The malondialdehyde (MDA) assay was performed according to Hodges et al. (1999).

### **Chlorophyll fluorescence measurement**

Modulated chlorophyll fluorescence emission from the upper surface of the leaf was measured with a Pulse Modulated Chlorophyll Fluorometer (FMS 1, Hansatech,

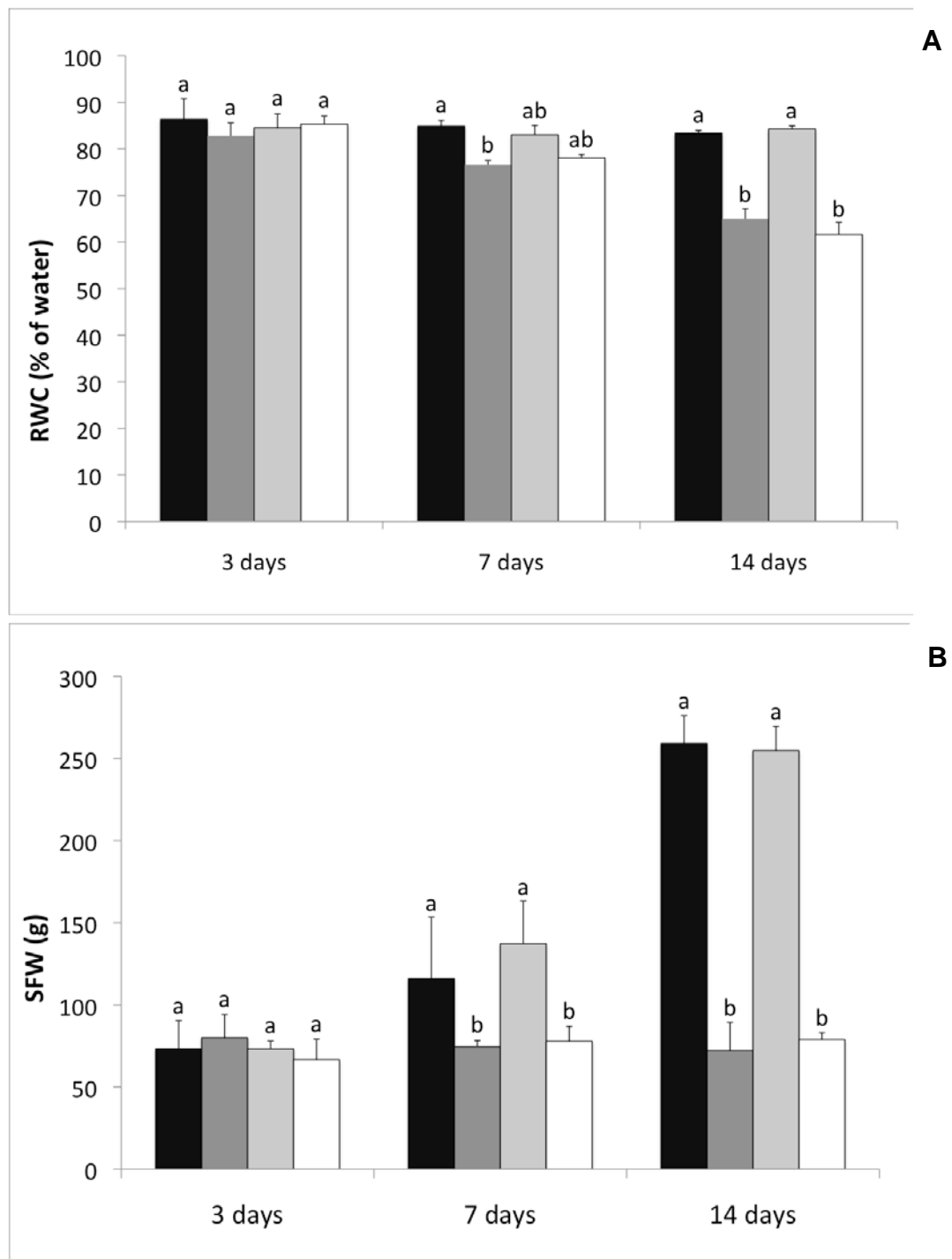


Figure 32. Physiological parameters of *Vigna unguiculata* plants exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 3, 7 or 14 days. (A) Relative water content and (B) shoot fresh weight. Control (black bars), drought (dark gray bars), ozone (light gray bars) and drought + ozone (white bars). Letters refer to homogenous subsets given by the ANOVA and Tukey's post hoc tests performed at a given time point. Treatments that share a letter were not statistically different ( $n = 4$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

Norfolk, UK). First,  $F_0$  and  $F_s$  (minimum fluorescence yield of dark- and light-adapted leaves, respectively), as well as  $F_m$  and  $F_m'$  (maximum fluorescence yield of dark- and light-adapted leaves, respectively) were obtained by applying a saturating pulse. Effective quantum yield of PSII was calculated according to Genty et al. (1989). The non-photochemical quenching (qN) was calculated according to Kooten & Snel (1990)

### **Total RNA extraction and real-time RT-PCR**

Leaves were ground in liquid nitrogen using mortar and pestle. Total RNA was then extracted using TRIzol Plus RNA Purification Kit (Life Technologies Corporation). After the extraction, RNA (50  $\mu$ g) was DNA-digested with Turbo DNA-Free (Invitrogen). Total RNA (1  $\mu$ g) was heated to 65 °C for 5 min and then cooled on ice for 2 min. The reverse transcription was performed using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio–Rad). Real-Time PCR reactions were performed with iQ™ SYBR Green Supermix (Bio–Rad) and specific primers for each target reaction (Table 1) in an iCyclerIQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio–Rad). Primers were obtained from both gene sequences retrieved from the genespace sequence (GSS) database of Cowpea Genomics Initiative (CGKB) (Chen et al. 2007) and from the NCBI gene bank (Table 1). The reference gene (*VuEF1 $\alpha$* ) showing the highest stability was selected using GeNorm (Vandesompele et al. 2002). The expression data presented in the figures are averaged from 3 biological replicates, in turn averaged from 3 technical replicates. PCR efficiency was between 80% and 110%, depending on primer pairs and on the CT values for each sample that were acquired by iCycler IQ™ software (Biorad).

For each gene, the expression level in treated samples (D, O and D+O) was normalized to the expression level measured in control samples. Target gene

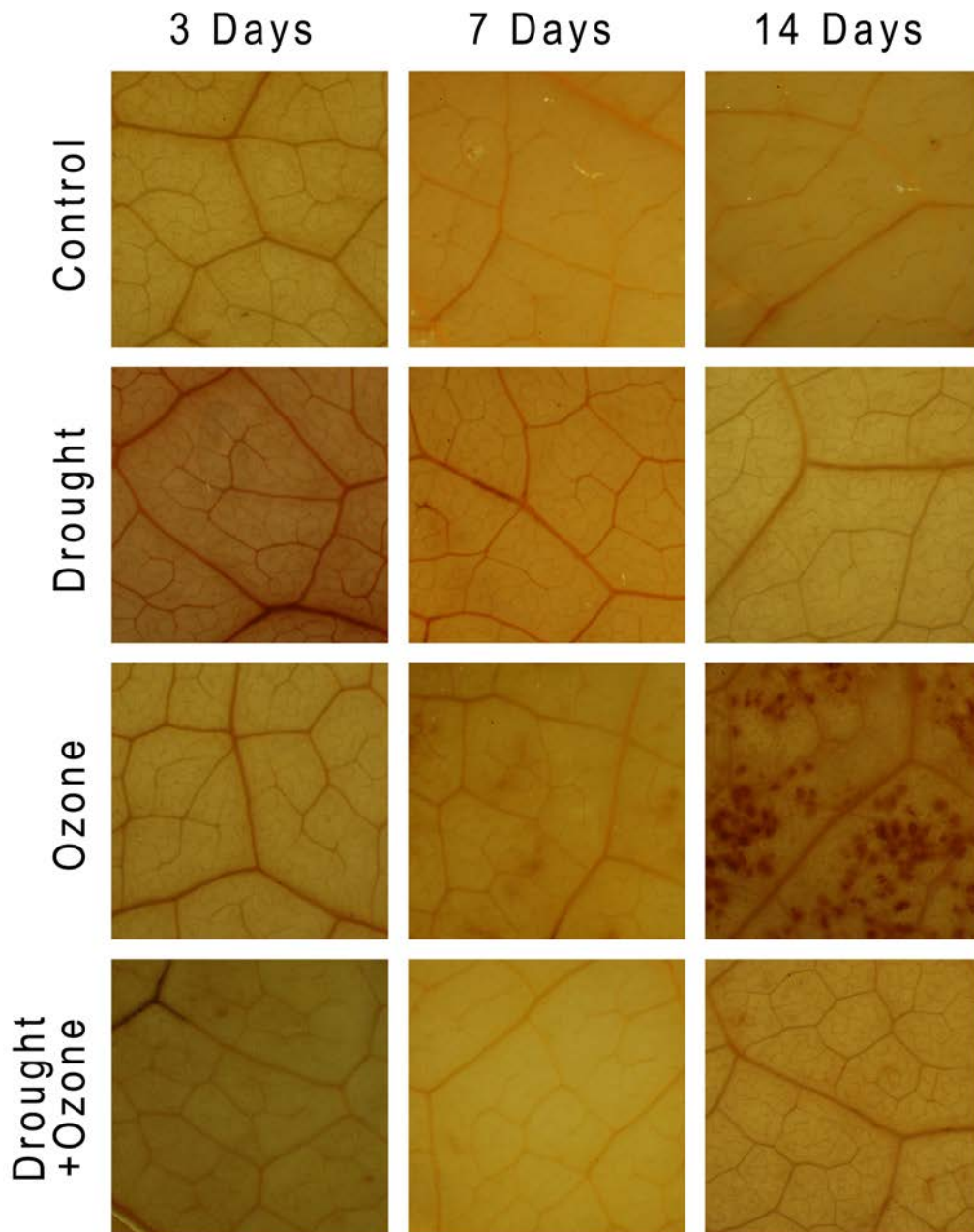


Figure 33. Detection of hydrogen peroxide accumulation using DAB staining of *Vigna unguiculata* (cv Epace) leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. Pictures are representative of three independent biological replicates. No specific staining was observed in control-treated leaves with ascorbic acid (data not shown). (DAB: 3,3'-diaminobenzidine)

expression was then normalized to the reference gene expression as described in the following formula:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref}(control-sample)}}$$

where E is the efficiency of the PCR, CT the cycle threshold, *target* the target gene, *ref* the reference gene, *control* the CT of control plants and *sample* the CT of stressed plants (Pfaffl 2001). The heat map and graphs show the ratio in a log<sub>2</sub> scale. Multi Experiment Viewer software (MeV 4.8.1) was used to draw the heat maps and to perform hierarchical clustering analysis (Saeed et al. 2003).

### **Bioinformatics**

Alignments of PTOX sequences were performed using ClustalW2 online tool (Larkin et al. 2007). Alignments were based on *Arabidopsis* (NM\_118352) and *Glycine max* (XM\_003546123) amino acid sequences deduced from the NCBI gene bank. The phylogenetic tree was constructed using a neighbor-joining algorithm through bootstrap statistical analysis with MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) software (Kumar et al. 2008). The access numbers of the sequences used to build the phylogenetic tree were: *Glycine max* (XM\_003546123), *Medicago truncatula* (XM\_003594116), *Lotus japonicus* (AK339732), *Ricinus communis* (XM\_002518365), *Populus trichocarpa* (XM\_002317154), *Arabidopsis thaliana* (NM\_118352), *Arabidopsis lyrata* (XM\_002867733), *Solanum lycopersicum* (NM\_001247582), *Oryza sativa* (NM\_001060734), *Brachypodium distachyon* (XM\_003580732), *Sorghum bicolor* (XM\_002448683), *Zea mays* (NM\_001157308), *Selaginella moellendorffii*

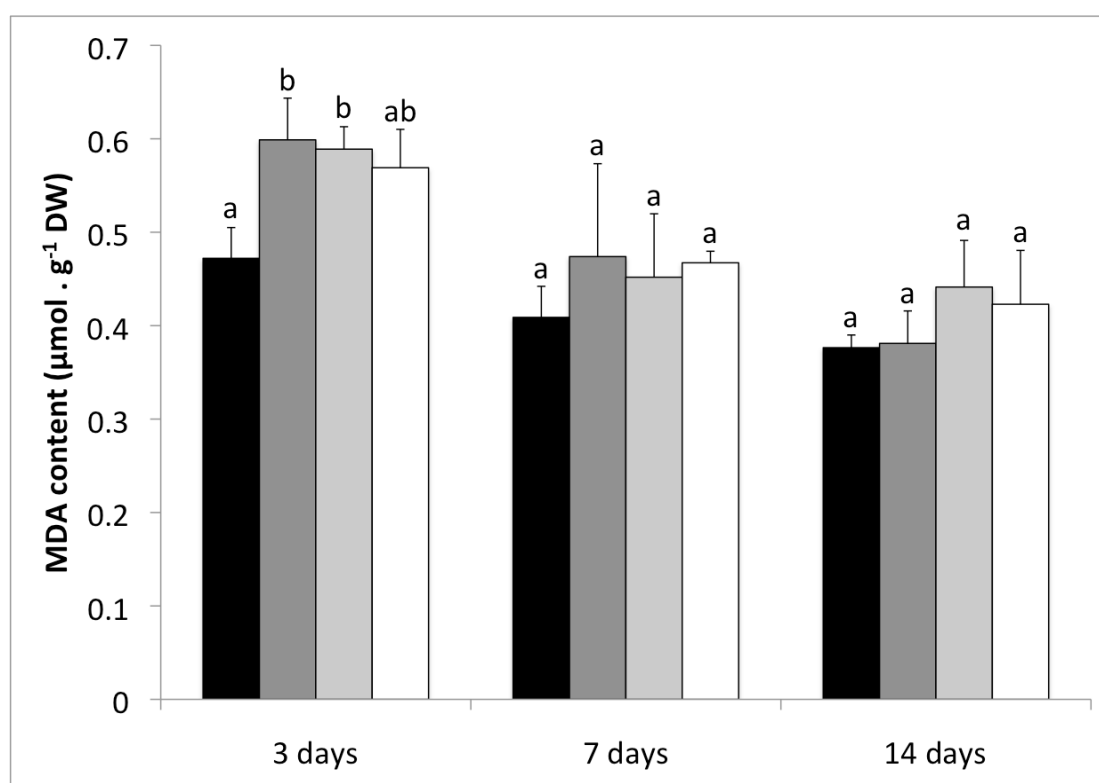


Figure 34. Malondialdehyde content in *Vigna unguiculata* (cv Epace) leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 3, 7 or 14 days.

Control (black bars), drought (dark gray bars), ozone (light gray bars) and drought + ozone (white bars). Letters refer to homogenous subsets given by the ANOVA and Students' post hoc tests performed at a given time point. Treatments that share a letter were not statistically different ( $n = 4$ ;  $\alpha = 0.05$ ).



(XM\_002980011), *Physcomitrella patens* (XM\_001766378), *Ostreococcus lucimarinus* (XM\_001420267), *Micromonas pusilla* (XM\_003061350), *Volvox carteri* (XM\_002950337), *Chlamydomonas reinhardtii* PTOX1 (XM\_001703414) and PTOX2 (XM\_001692548), *Arachis hypogaea* (GO340514.1 and GO257426.1), *Trifolium pretense* (BB922595.1 and BB919345.1) and *Phaseolus acutifolius* (HO779755 and HO808793).

### **Statistical analysis**

For a given parameter at a given time point, the differences between treatments was tested through the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey or Student post-hoc tests ( $\alpha = .05$ ).

```

Vigna      MAAIL---SSSLFASSCLP-----KPLS--HSRTHHTAPP-----LLR----ARASLL 38
Glycine    MAAIF---SSSLFASSPLP-----KPLSSSYSRIHTAPQ-----LFR----ARSSLL 40
Arabidopsis MAAISGISSGTLTISRPLVTLRRSRAAVSYSSSHRLLHHLPLSSRLLLLRNHRVQATIL 60
          ****  *.:* * * . * : * * *:* * :.:*:

Vigna      QDNEEKVIVQDSFPPSKSSPLHTTNGKSSVDSISTSAFEKGIKVEQSVNIFLTDSEVIKIL 98
Glycine    QDNEKKVIVHDSFPPSKTSPLHTADKSTGGNSINTSAFEKRIKVEQSVNIFLTDSEVIKIL 100
Arabidopsis QDDEEKVVVEESFKAETSTGTGTEPLEEPNMSSSSTSAFEETWIIKLEQGVNVFLTDSEVIKIL 120
          **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*. . . . * .*****. **:*:*:*:*:*****

Vigna      DTLYNDRYARFYVLETTIARVYFVAFMSVLEMYESFGWRRADYLKVHFAESWNEMHHTL 158
Glycine    DTLYHDRHYARFFVLETTIARVYFVAFMSVLEMYESFGWRRADYLKVHFAESWNEMHHTL 160
Arabidopsis DTLYRDRTYARFFVLETTIARVYFVAFMSVLEMYETFGWRRADYLKVHFAESWNEMHHTL 180
          ****.* ***:*:*****:*****:*****:*****:*****

Vigna      IMEELGGNAWWFDRFLAQHIAIFYYIMTVLMAISPRMAYHFSECVEESHAFETYDKFLKV 218
Glycine    IMEELGGNAWWFDRFLAQHIAIFYYIMTVLMAVSPRMAYHFSECVEESHAFETYDKFIKV 220
Arabidopsis IMEELGNSWWFDRFLAQHIATFYFMTVFLYILSPRMAYHFSECVEESHAFETYDKFLKA 240
          *****:***** ***:***:.* :*****:*****:*****:*.

Vigna      QGEELKKMPPEVAVKYYTGDDLYLFDEFQTSRVPNSRRPKIDNLYDVFVNIKRDDEAEHC 278
Glycine    QGDELKKMPAPEVAVNYTGDDLYLFDEFQTSRVPNSRRPKIENLYDVFVNIKRDDEAEHC 280
Arabidopsis SGEELKNMPAPDIAVKYYTGDDLYLFDEFQTSRTPNTRRPVNIENLYDVFVNIKRDDEAEHC 300
          .*:***:*. *.:*:*:*. *****. *****. *.:*** *:*****:*****

Vigna      KTMKACQIHGNLRSPHSYAEDDDD---VSVCAEADCEGIVDCIKKSVNPDPANVK 331
Glycine    KTMKACQTHGNLRSPHSYAEDDDD----SSVCALEADCEGIVDCIKKSVASNPAPKVK 332
Arabidopsis KTMRACQTLGSLRSPHSILEDDDDTEESGCVVPEEAHCEGIVDCLKKSITS----- 351
          ***:*** *.****** ***. . * . **.******:***: .

```

Figure 35. Alignment of deduced amino acid sequences of the PTOX protein from *Vigna unguiculata* with previously reported PTOX sequences in *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana*.

Amino acid residues observed in all di-iron carboxylate proteins and implied in the iron-binding site are highlighted in black (Fu et al. 2009). The amino acids highlighted in gray in *Vigna* PTOX sequences represent the transit peptide deduced from SignalP 4.0 (Petersen et al. 2011).

## Results

### Growth and symptoms

Two ozone indices were determined in this study. The first one, AOT40, is based on the external ozone concentration (exposure) while the second one, POD<sub>0</sub>, rather indicates stomatal ozone uptake (dose). At the end of the fumigation period, the AOT40 index reached a maximum of 16.47 ppm h (table 2). To calculate the POD<sub>0</sub> index, it is indispensable to take into account stomatal conductance (g<sub>s</sub>). The ozone treatment alone tended to lower stomatal conductance, but no significant differences were found (table 2). For plants subjected to combined O<sub>3</sub> exposure and drought (D+O), the evolution of stomatal conductance followed the same profile as drought alone (D), with strong stomatal closure at the end of the treatment (table 2). Consequently, the evolution of POD<sub>0</sub>, based on the O<sub>3</sub> flux entering the leaves, tended to be lower in D+O plants than in O plants (table 2). However, even if this tendency was more remarkable 14 days after the stress was applied, no statistically significant values were noted between the two D+O and O treatments.

Relative water content (RWC) and shoot fresh weight SFW were determined on *Vigna unguiculata* plants throughout the experiment (figure 32A and B). D plants and D+O plants had significantly lower RWC values: -10% and -25% on the 7<sup>th</sup> and the 14<sup>th</sup> day after the stress was applied, respectively (figure 32A). The same profile was observed for SFW values. Indeed, drought, combined or not with O<sub>3</sub>, diminished SFW by 40% and 70% on the 7<sup>th</sup> and the 14<sup>th</sup> day after exposure to the constraints, respectively (figure 32B). So drought stress alone drastically impaired the development of the plants and the presence of O<sub>3</sub> did not have any additional effect on these parameters.

Leaf discs were stained with DAB to detect the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a marker of oxidative stress. After the 3<sup>rd</sup> day, plants did not show any noticeable difference

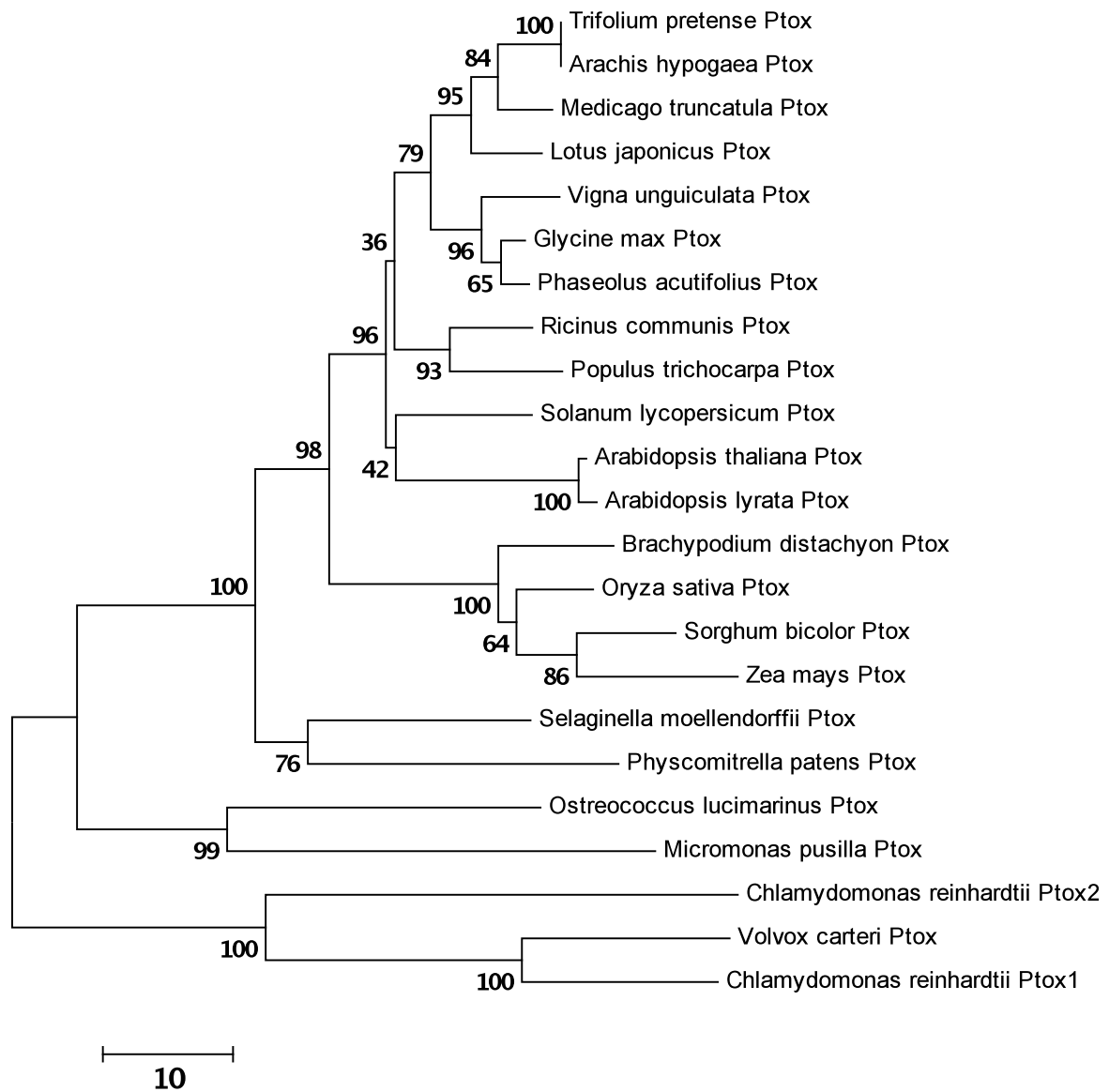


Figure 36. Unrooted phylogenetic tree of various PTOX proteins in plants and bacteria. Phylogenetic tree was constructed using a neighbor-joining algorithm through bootstrap statistical analysis with MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) software (Kumar et al. 2008)

whatever the treatment applied (figure 33). However, after the 7<sup>th</sup> day, the plants subjected to O<sub>3</sub> treatment showed a slightly diffuse reddish color, while on the 14<sup>th</sup> day leaves showed distinct dark red spots (figure 33). After 7 or 14 days treatment, D and D+O leaves displayed much lower levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figure 33). MDA levels were also analyzed to assess the level of lipid peroxidation as a marker of oxidative damage of the leaf tissues. After 3 days, all treatments (D, O and D+O) induced an increase in MDA content as compared to the control leaves (figure 34). After 7 and 14 days, the differences between control and treated plants were not statistically significant, although stressed plants tended to show higher MDA contents (figure 34).

### **PTOX characterization**

A set of 13 mRNA fragments isolated from *Vigna unguiculata* were identified in NVBI and CGBK databases. The *in silico* fragment assembly led to a putative full-length cDNA of 1,369 bp encoding a polypeptide of 331 amino acid residues (Fig 3A). An N-terminal transit peptide (TP), that targets proteins to plastids, was found using SignalP 4.0 software (Petersen et al. 2011) (figure 35). *Vigna* and *Arabidopsis* PTOX protein sequences showed a high degree of homology (67%) and all the amino acids essential for the structure and activity of the protein were conserved (figure 35). In particular, the glutamate and histidine residues (Glu-136, Glu-175, His-178, Glu-227, Glu-296, and His-299) that form the iron-binding site were all present, which is a common feature of PTOX and AOX proteins (Fu et al. 2009). A phylogenetic tree with 23 PTOX protein sequences from plants and other phototrophic organisms was constructed by the neighbor-joining method (figure 36). Sequences from algae, bryophytes, lycophytes and higher plants clustered separately. Among plant PTOXs, sequences from Eudicots and Monocots formed two separate groups. The deduced polypeptide of *V. unguiculata* PTOX clustered

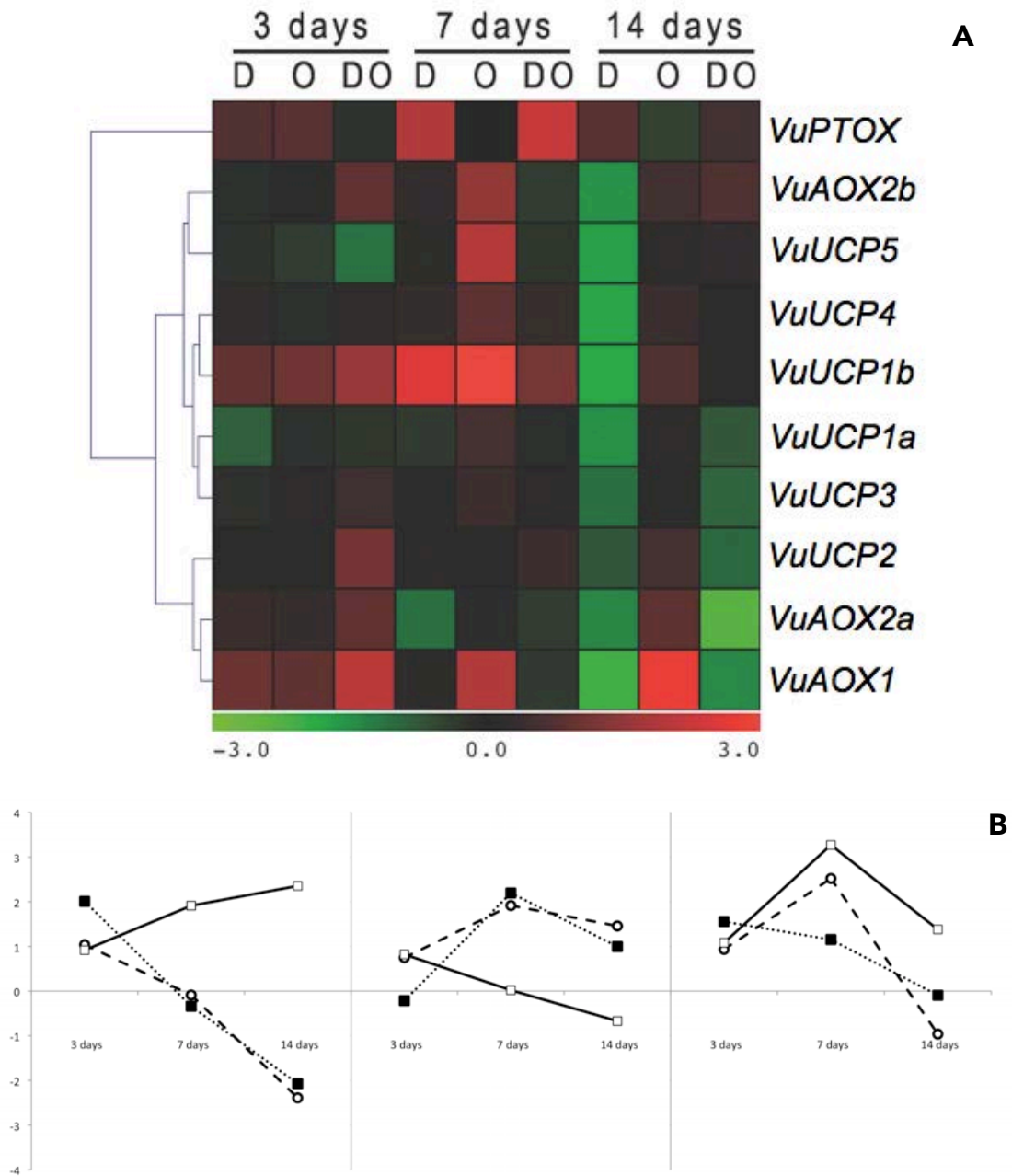


Figure 37. Expression analysis of AOX, PTOX and pUCP genes in *Vigna unguiculata* (cv Epace) leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments. (A) Results are presented as a heat map (Multi Experiment Viewer (MeV 4.8.1) software) showing the expression of AOX, PTOX and pUCP genes in treated *V. unguiculata* leaves relative to the control on a log<sub>2</sub> scale (green: down-regulation of gene expression; red: up-regulation of gene expression). Gene expression patterns were submitted to a hierarchical clustering analysis (MeV 4.8.1 software); the resulting tree is shown on the left of the heat map. (B) Relative expression of three selected genes (*VuAOX1*, *VuPTOX* and *VuUCP1b*) relative to the control on a log<sub>2</sub> scale in plants exposed to drought (open circles), ozone (open squares) and drought + ozone (filled squares) (B). Data are the means of 3 biological replicates and 3 technical replicates.

together with PTOX proteins from the closely related Eudicots soybean and *Medicago* (figure 36).

### **Expression analysis**

A hierarchical clustering analysis of gene expression patterns revealed a distinct separation between the chloroplastic (PTOX) and mitochondrial (AOX and pUCP) genes studied (figure 37A). In the AOX gene group, a clear separation between *VuAOX2b* on the one hand and *VuAOX1* and *VuAOX2a*, on the other hand, was noticed. The expression of most pUCP genes (*VuUCP1a*, 2, 3 and 4) was hardly modified in response to the constraints (figure 37A), with the exception of *VuUCP1b* and *VuUCP5*, which showed the strongest responses (figure 37A). Finally, *VuPTOX* expression pattern diverged from the others. The detailed expression patterns *VuPTOX*, *VuAOX1* and *VuUCP1b*, which showed the strongest responses, are shown in Fig. 4B. During the time-course of the experiment, *VuAOX1* expression formed two groups according to the applied stress (figure 37B). The gene was up-regulated in O<sub>3</sub>-treated plants, with a 2-fold change after 3 d, a 4-fold change after 7 d, and a 5.7-fold change after 14 d. Meanwhile, *VuAOX1* was also up-regulated after 3 days drought stress, alone or combined with ozone, but was then severely down-regulated, reaching a -5.3-fold change after 14 days. Except after 3 d, *VuPTOX* expression under the different stress conditions displayed a reverse profile as compared to *VuAOX1* (figure 37B). Under O<sub>3</sub>, its expression was progressively inhibited and reached -1.6-fold change after 14 days. Drought stress (D and D+O) induced *VuPTOX* expression with a maximum 4-fold change after 7 d. Like *VuAOX1*, *VuUCP1b* was up-regulated after 3 d and 7 d in response to all treatments. After 14 days, *VuUCP1b* up-regulation was maintained under O<sub>3</sub> with a lower variation (2.6-fold change), while its expression was down-regulated (-2-fold change) under drought stress alone. At the same time, the expression of *VuUCP1b* in leaves

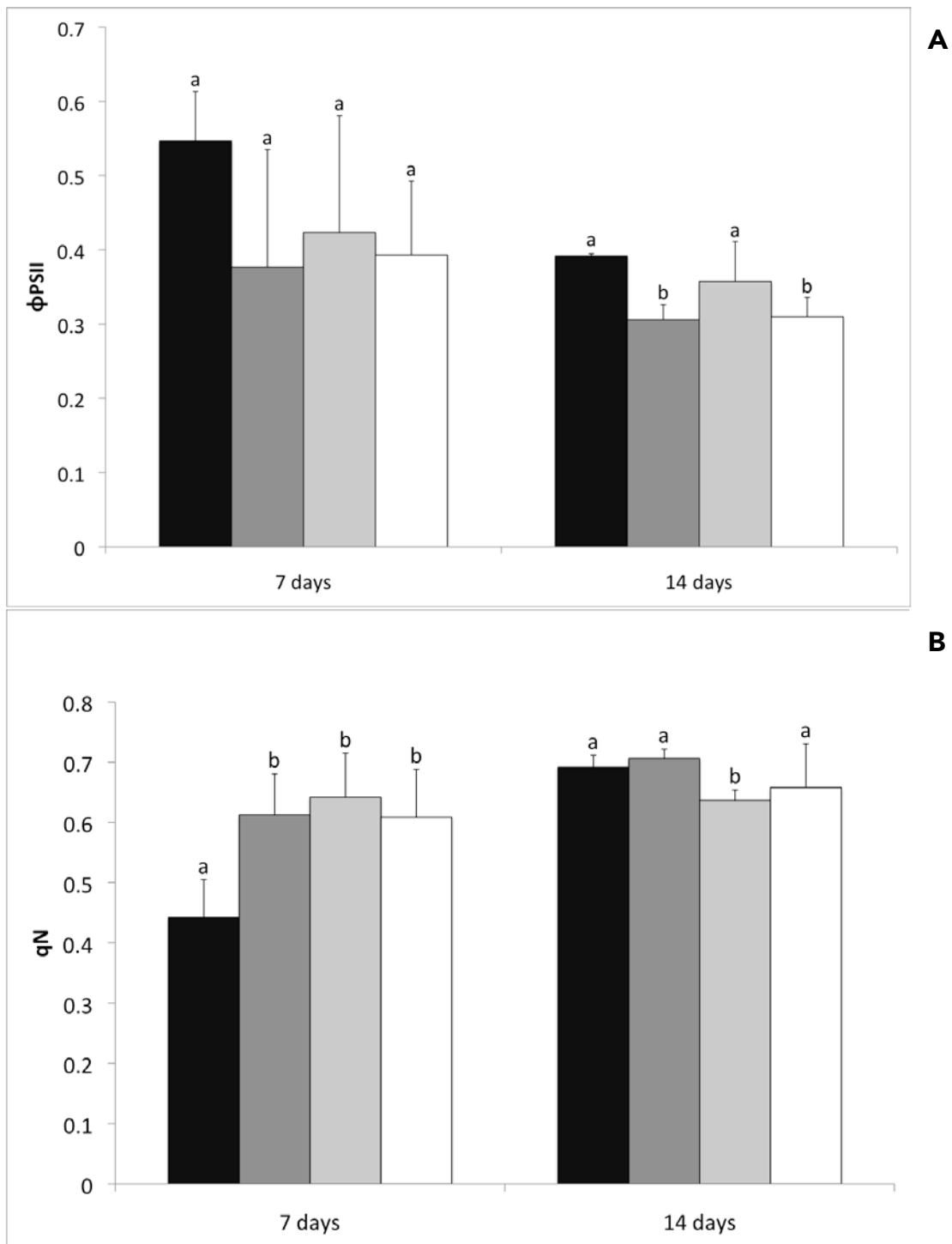


Figure 38: Photosynthesis efficiency of *Vigna unguiculata* (cv Epace) leaves exposed to drought, ozone and drought + ozone treatments, during 7 or 14 days. (A) Effective PSII quantum yield ( $\phi_{PSII}$ ) and (B) non-photochemical quenching (qN). Control (black bars), drought (dark gray bars), ozone (light gray bars) and drought + ozone (white bars). Letters refer to homogenous subsets given by the ANOVA and Students' post hoc tests performed at a given time point. Treatments that share a letter were not statistically different ( $n = 4$ ;  $\alpha = 0.05$ ).



subjected to the combination of drought and ozone treatments went back to control levels.

### **Fluorescence analysis**

The analysis of PSII chlorophyll fluorescence was carried out to assess the PSII quantum yield (figure 38A) and the non-photochemical quenching (qN) of *Vigna unguiculata* (figure 38B). Under all stress conditions,  $\phi_{\text{PSII}}$  tended to decrease after 7 days. After 14 days, only drought applied alone or combined with O<sub>3</sub> exposure maintained a lower  $\phi_{\text{PSII}}$  (figure 38A). The non-photochemical quenching (qN) showed an opposite pattern as compared to  $\phi_{\text{PSII}}$  after 7 days, with higher values than the control in all treatments (figure 38B). After 14 days, the qN for control plants reached a value close to those determined for the different stresses, only O plants showed a lower value.



## Discussion

### ***PTOX characterization***

The plastid terminal oxidase (PTOX) was identified in 1999 by two separate research groups (Carol et al. 1999; Wu et al. 1999). PTOX, a plastid-localized plastoquinol oxidoreductase, can be found in a wide variety of phototrophic species including algae and higher plants (Carol and Kuntz 2001; Kuntz 2004). The protein is predicted to play an important role in the reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O in chloroplasts and could be involved in the chlororespiratory pathway (Cournac et al. 2000). Bioinformatics and molecular evidence indicate that PTOX is encoded by a single gene in the genome of higher plants (Sun and Wen 2011). Our work on EST databases suggests that the *Vigna unguiculata* genome also carries a single gene encoding a PTOX protein, transcribed into an mRNA of 1,369 bp, with a transit peptide that targets the protein to the chloroplasts (figure 35). As found for the *Arabidopsis* gene, the *VuPTOX* gene consists of 9 exons interrupted by 8 introns (Fu et al. 2005). The translated protein is composed of 331 amino acids and shares 67% homology with *Arabidopsis* PTOX and 88% with *Glycine max* PTOX; 20 amino acids are perfectly conserved in the PTOX sequences between the three species. Sequence alignments revealed that 6 out of the 20 conserved amino acids are putative iron-binding residues and are highly conserved in the sequences of all AOX and PTOX proteins examined to date (Fu et al. 2005; Fu et al. 2009). PTOX is proposed to have four  $\alpha$ -helices and a di-iron center (Fu et al. 2009). Two of these helices are hydrophobic; they anchor the protein in the thylakoid membrane. Given the ancient nature of the primary endosymbiotic events, the taxonomic distribution of AOX and PTOX is predicted to be widespread. Indeed, the large number of PTOX sequences recently deposited in gene banks supports this expectation. Their broadening distribution also strengthens the hypothesis that PTOXs spread vertically through the prokaryotic and eukaryotic domains (McDonald & Vanlerberghe 2006).



The presence of PTOX sequences in bryophytes, lycophytes and algae suggests that PTOX appeared early in plant evolution (Kuntz, 2004). However, the taxonomic distribution of PTOX in prokaryotes and eukaryotes and its evolutionary history indicate that unlike some other quinol oxidases, PTOX is only present in organisms that exhibit oxygenic photosynthesis (McDonald et al. 2011). In the phylogenetic tree shown in figure 36, PTOX genes from Eudicots and Monocots clearly diverge. Nevertheless, the Fabaceae family, represented here in seven different genera, forms a compact group and shares highly similar PTOX genes. It should also be highlighted that, similarly to AOX genes (Costa et al. 2004), PTOX genes from *Vigna unguiculata* and *Glycine max* are orthologous. The alignment between soybean and *V. unguiculata* orthologous protein pairs (figure 35) confirms the high degree of homology indicated in the phylogenetic tree.

### **Physiological responses**

Nowadays, it is largely accepted that environmental constraints, including drought and ozone exposure, have an unfavorable impact on vegetation (Morgan et al. 2003; Ibáñez et al. 2010). The impact of O<sub>3</sub> exposure on vegetation has been well studied in the last two decades in North America and European countries, and these works unanimously underlined the fact that O<sub>3</sub> is an important environmental factor that could limit crop yield. Except for a few studies (Dafré-Martinelli et al. 2011; Alves et al. 2011), the effect of ozone on tropical species is still largely unknown, as is the critical ozone level for crops cultivated in tropical regions. In this scenario, we investigated the responses of *Vigna unguiculata*, a tropical crop of northeast Brazil, in response to drought, elevated O<sub>3</sub> and the combination of both, through gene expression.

In accordance with Mills et al., (2007) soybean, a Fabaceae closely related to *Vigna unguiculata*, is a moderately sensitive crop with a critical level of 4.3 ppm h O<sub>3</sub> for 5% yield reduction. In this study *Vigna* plants were submitted to a relatively high



ozone exposure level that reached an AOT40 of 16 ppm h at the end of O<sub>3</sub> exposure, which is four times higher than the critical level for soybean. However, at this elevated O<sub>3</sub> exposure level, growth of *Vigna unguiculata* plants did not seem to be affected, since no significant difference between O<sub>3</sub>-treated and control plants was observed in terms of growth, water content and photosynthesis. Leaf phenology is a decisive factor that influences ozone sensitivity in plants. It is widely accepted that mature leaves are more sensitive to ozone than younger, expanding ones (Pääkkönen et al. 1996; Strohm et al. 1999; Bagard et al. 2008). Therefore, working with the first trifoliolate leaf, which was completely developed at the beginning of the treatments, allowed us to observe ozone injuries even if the SFW was not affected. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation was detected in the leaves of O<sub>3</sub>-treated plants after 7 days and to a greater extent after 14 days treatment (figure 33). The higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level in O<sub>3</sub>-exposed plants could be explained by the instability of ozone and its decomposition within leaf tissues, which leads to the formation of reactive oxygen species (ROS) such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kangasjärvi et al. 1994). In our experiment, ozone also accelerated leaf damage, abscission and senescence (data not show), as mentioned in previous works (Pell et al. 1997; Wittig et al. 2007). MDA formation resulting from the reaction of ROS with polyunsaturated lipids (Bielski et al. 1982) was perceptible after 3 days O<sub>3</sub> exposure. However, after 7 and 14 days, MDA contents were not significantly different from the control. The formation of oxidized products derived from the catabolism of fatty acids is known to play a role in the induction of many defense genes in plants (Creelman and Mulpuri 2002). This could explain why under O<sub>3</sub> treatment, *VuAOX1*, *VuPTOX* and *VuUCP1b* were up-regulated after 3 days. For *VuAOX1*, up-regulation was maintained throughout the experiment (figure 37B). AOX up-regulation has already been described in response to O<sub>3</sub> exposure (Ederli et al. 2006; Dutilleul et al. 2003). In addition, Costa et al. (2010) showed the presence of cis-elements on *VuAOX1* that respond to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. AOX seems to play a crucial role in optimizing metabolic efficiency for the adaptive regulation of growth and





development (Arnholdt-Schmitt et al. 2006). The mitochondrial uncoupling protein (*VuUCP1b*) was also up-regulated in response to ozone treatment, with a maximum after 7 days fumigation. Members of the pUCP and AOX families have been shown to be expressed in a time/tissue/stress-dependent manner (Figueira and Arruda 2011). Nonetheless, both enzymes (AOX and pUCP) may well operate together to optimize mitochondrial electron flux and photorespiration rate (Sweetlove et al. 2006). In this regard, *VuPTOX*, the plastidial counterpart of AOX, was up-regulated after only 3 days O<sub>3</sub> exposure, and then down-regulated after 7 and 14 days. The fluorescence analysis showed that PSII tended to decrease after 7 days of O<sub>3</sub> exposure, while qN increased, which could suggest an activation of chlororespiration. In addition, mitochondria could be involved in balancing the redox equivalents from the over-reduced photosystems (Ibáñez et al. 2010; Sweetlove et al. 2006).

Plants subjected to drought or drought combined to O<sub>3</sub> exposure showed a drastic reduction of their RWC (figure 32A) and SFW (figure 32B) values, by 25% and 70%, respectively, when compared to the control. In fully-developed leaves of *Vigna unguiculata* plants subjected to drought stress, Torres-Franklin et al., (2007) found that the RWC dropped from 83% to about 58% of the control values, while leaf water potential decreased from -0.3MPa to -1.5MPa. In our experiment, the RWC reached 60% of the control value, which indicates severe drought stress. This probably explains why growth and biomass production stopped in plants subjected to drought alone or combined with ozone. Even so, drought did not induce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation as ozone did (figure 33). Under drought stress, one of the main threats for chloroplasts is the production of the hydroxyl radical (\*HO) in the thylakoid through the "iron-catalyzed" reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the Haber-Weiss reaction (Cruz de Carvalho 2008). The hydroxyl radical is the ROS with the shortest half-life (~1 ms) but it also has an extremely strong oxidizing potential and reacts with almost any



biological molecule. However, drought was responsible for a higher MDA content in *Vigna unguiculata* leaves 3 days from the beginning of treatments. In this context, we could suggest that plants subjected to drought were able, after a period of cell dysfunction, to set up a series of protection mechanisms to mitigate ROS formation. One of the possible mechanisms could be the increase in *VuPTOX* and *VuUCP1b* expression after 7 days D and D+O treatments. PTOX and pUCP could contribute to limiting ROS formation in chloroplasts and mitochondria, respectively. Previous works reveal that pUCP genes were up-regulated under drought stress (Pastore et al. 2007). Signaling processes following the perception of drought stress could trigger a plastidial response. More specifically, the increase in PTOX activity could be due to an over-oxidized PQ pool. It is already known that PQ redox state can regulate PTOX expression (McDonald et al. 2011). More recently, microarray data revealed that *AtPUMP1* and *AtPUMP5* genes are induced by drought (Vercesi et al. 2006). Several lines of evidence indicate that the uncoupling protein (pUCP) has a prominent role in maintaining mitochondrial functioning under normal and drought conditions (Begcy et al. 2011). Previous studies showed an increase in AOX gene expression, protein content, as well as AOX capacity, in plants subjected to drought (Costa et al. 2007; Bartoli et al. 2005). However, in our experiment, after 7 days and 14 days the AOX genes were down-regulated. Consequently, we can suggest that, unlike PTOX and UCP, AOX is not implied in long-term drought tolerance mechanisms in *Vigna unguiculata*. The fluorescence analysis of the plants subjected to drought combined or not with ozone showed a downward tendency in PSII values for all time-points tested. On the other hand, qN values increased 7 days after the beginning of drought treatments. Taking together the photochemical responses and the up-regulation of the PTOX gene, we can suggest that the chlororespiratory pathway was activated to alleviate the effects of drought on the plant photosynthetic apparatus. Down-regulation of the photosynthetic linear electron



transport, concomitant with the increase in PTOX protein, has been showed in response to drought, heat and high illumination (Ibáñez et al. 2010).

When we compared  $POD_0$  for the plants subjected to  $O_3$  alone or combined with drought at the end of the experiment, no significant difference was found between the two treatments. Consequently, in the time-scale of our experiment, drought did not seem to affect stomatal ozone uptake. Reciprocally, considering that stomatal conductance did not differ between D and D+O treatments, it is difficult to argue that  $O_3$  exposure could deregulate the typical stomatal response to drought stress as recently suggested by Wilkinson and Davies (2010). Overall, our results indicate that the effect of drought stress overruled those of the ozone treatment. Although drought clearly induced stomatal closure, stomatal ozone uptake remained substantial in the plants subjected to the combined stresses. Thus, we can propose that plants subjected to drought set up acclimation processes that can mitigate the oxidative stress induced by ozone uptake. As for drought, a higher expression of the uncoupling proteins (PTOX and pUCP) was detected as a response to combined drought and ozone stresses (figure 37A). Therefore, the up-regulation of these two proteins due to drought stress could also have an important role in preventing ozone-induced ROS formation when the plants are simultaneously subjected to the two constraints.



## 6- ANALYSE DE L'EXPRESSION DE L'AOX (RESULTATS PRELIMINAIRES)

Afin d'étudier l'expression de l'AOX dans les feuilles de *Vigna unguiculata*, un protocole pour l'extraction de protéines membranaires a été mis au point et décrit dans la partie matériel et méthodes (3.4). Cette technique d'extraction a permis d'avoir un signal plus fort pour les protéines d'intérêt a la fin du Western blotting.

Les résultats obtenus avec les plants de *Vigna unguiculata* exposés pendant 14 jours à la sécheresse, à l'ozone et la combinaison des deux contraintes, sont présentés dans la figure 39. Le western blotting révèle la présence de plusieurs bandes. Une faible bande entre 75 et 50 kDa qui correspond à la forme oxydée de l'AOX (70 kDa) (figure 39). En dessous, trois bandes très rapprochées et pour une masse d'environ 37kDa qui correspondent probablement à trois différentes isoformes de l'AOX dans sa forme réduite (35 kDa) (figure 39). Les autres bandes, de plus faible masse moléculaire, doivent correspondre à des protéines qui réagissent de façon non-spécifique avec l'anticorps dirigé contre l'AOX. Une bande parasite de forte intensité est située à la hauteur de 25 kDa (figure 39). Les bandes suggérées comme étant l'AOX voient leur intensité très faiblement modifiée chez les plantes exposées a la sècheresse appliquée seule. Par contre, les plantes exposées a l'O<sub>3</sub> seul vont se différencier avec le renforcement de l'une des bandes et la disparition des autres. Pour les plantes exposées à la combinaison des deux contraintes ozone et sécheresse, une bande, différente de celle amplifiée sous O<sub>3</sub> voit son intensité augmentée.

L'analyse de l'expression des gènes a montré que *VuAOX1* est le gène le plus fortement sur-regulé par le stress d'ozone au cours du traitement. Les résultats de Western blot confirment ce résultat puisqu'une forte augmentation de la forme

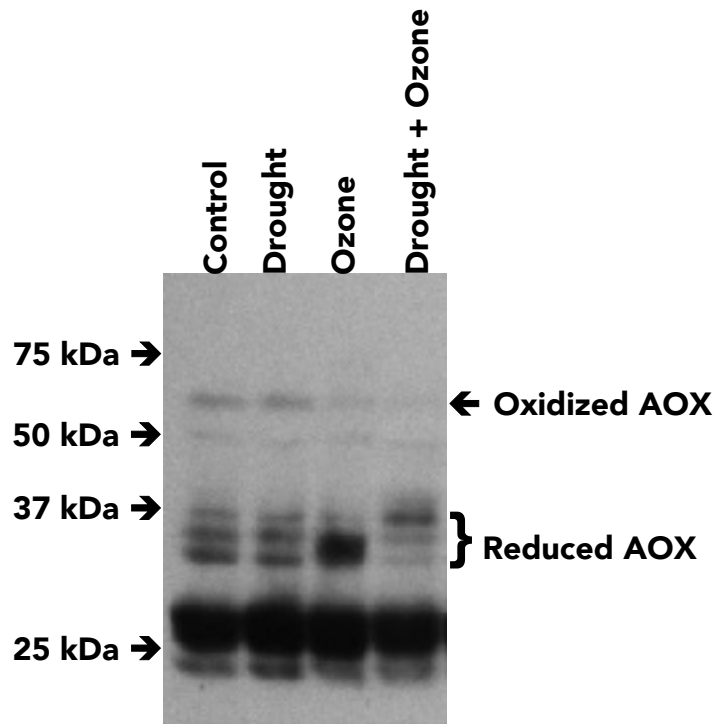


Figure 39: Western blotting of AOX from membrane proteins of *Vigna unguiculata* plants exposed to drought (D), ozone (O) and the combination of both (D+O) during 14 days.



réduite de l'AOX est observée pour les plantes exposées à l'O<sub>3</sub> seul. Par ailleurs, pour les plantes exposées à la combinaison des deux contraintes, nous avons observé une sur-régulation du gène *VuAOX2a*, ce qui pourrait concorder avec l'augmentation d'une des bandes réduites de l'AOX, différente de celle qui augmente sous ozone. Le western blotting de l'AOX permet également d'avoir une idée de l'état de l'activité *in vivo* de cette enzyme. En effet, l'AOX est connue pour être soit sous la forme d'un dimère (70 kDa) soit sous la forme monomère (37 kDa) (Umbach, Ng, & Siedow, 2006). La configuration dimère (oxydée) de l'AOX correspond à une forme inactive de la protéine, alors que la forme monomère (réduite) correspond à une forme active. Ces deux configurations sont interchangeables, et le passage de l'une des configurations à l'autre est proposé comme un mécanisme pour réguler l'activité de la protéine. Nos résultats montrent que l'AOX se trouve principalement dans les tissus sous la forme réduite et cela quel que soit le traitement reçu par les plantes. Sous ozone ou la combinaison des contraintes ce sont également des formes réduites qui sont sur-régulées indiquant que non-seulement cette protéine est surexprimée mais qu'elle est active dans les tissus, pouvant ainsi diminuer la formation de ROS dans les mitochondries.



# CONCLUSIONS & PERSPECTIVES



## 7- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les plantes ont évolué pour s'adapter à des environnements où elles sont souvent exposées à une combinaison de contraintes. Ne pouvant pas se déplacer, elles ont développé des mécanismes spécifiques leur permettant de détecter des changements environnementaux précis et ainsi de répondre à des conditions de contraintes complexes, en essayant de minimiser les dommages. Aujourd'hui, l'agriculture moderne se trouve face à de nouveaux défis qui tiennent à l'accroissement de la population mondiale, aux conséquences des changements climatiques et à l'émergence de nouvelles contraintes abiotiques, telles que la pollution atmosphérique. Dans ce contexte, l'une des grandes préoccupations actuelles des chercheurs, est de comprendre les mécanismes sous-tendant la plasticité du métabolisme végétal et qui vont permettre la tolérance ou l'adaptation des plantes à ces contraintes. Certaines fabacées, telles que le haricot, la lentille (*Lens culinaris*), le lupin, le pois ou les arachides sont cultivées pour leurs graines, utilisées pour la consommation humaine et animale ou pour la production d'huiles à usage industriel. Les fabacées, de part leur capacité de fixer l'azote atmosphérique, sont également essentielles pour la régénération des sols pauvres ainsi que pour fournir les protéines, les minéraux et les vitamines nécessaires pour les humains et le bétail. Leur culture peut ainsi représenter un moyen d'améliorer la subsistance des petits agriculteurs à travers le monde. C'est ainsi que *Vigna unguiculata* est une espèce cultivée dans les régions tropicales et équatoriales, en général dans le cadre de l'agriculture de subsistance.

Les travaux sur le niébé sont développés au sein du laboratoire de Biochimie de l'Université Fédérale du Céara (Brésil) depuis trente ans, et portent sur l'étude du métabolisme énergétique par des approches de physiologie végétale et de biologie moléculaire. Ces dernières années, la collaboration avec les UMR EEF (Nancy,



France) et Bioemco (Créteil, France) a été ciblée sur la compréhension du métabolisme énergétique mitochondrial du niébé face aux contraintes environnementales (salinité, déficit hydrique, pollution ozone), en utilisant comme modèle de recherche des cultivars de *V. unguiculata* dotés de différents degrés de sensibilité au stress hydrique. Pour le métabolisme énergétique lié à la mitochondrie, l'alternative oxydase (AOX) a été choisie comme enzyme cible pour ces études. L'AOX a ainsi été caractérisée biochimiquement et moléculairement et des hypothèses quant à son rôle ont été suggérées (Costa et al., 2004, 2007, 2010; Lima-Júnior et al., 2000). Actuellement, l'AOX est considérée comme étant une protéine clé dans la reprogrammation cellulaire lors du développement ou de l'acclimatation des plantes aux stress (Arnholdt-Schmitt, Costa, & Fernandes de Melo, 2006). Plus récemment, une collaboration avec une équipe de l'Université de Rosario (Argentine) a également permis d'amorcer une étude moléculaire sur la PTOX, oxydase analogue de l'AOX et située dans les chloroplastes.

Mon travail de thèse s'est positionné dans un contexte de recherche de marqueurs de tolérance à la sécheresse et à l'ozone, en vue d'améliorer la croissance et le développement du niébé (*Vigna unguiculata*), espèce cultivée d'intérêt pour les régions arides. La sécheresse et l'ozone constituent aujourd'hui deux contraintes dont les effets sur la végétation sont exacerbés dans un contexte de changement climatique. Une démarche de sélection de cultivars de niébé basée sur les composés lipidiques membranaires a déjà conduit à retenir le digalactosyldiglycéride (DGDG) comme un marqueur potentiel de tolérance à sécheresse (Torres-Franklin et al., 2007). Des différences d'induction des systèmes antioxydants ont également été observées pour ces cultivars (Contour-Ansel et al., 2006; Torres-Franklin et al., 2007). Dans mon travail, le choix des marqueurs éventuels de tolérance s'est porté sur trois protéines : l'AOX, la PTOX ainsi que sur la pUCP protéine découplante de la mitochondrie. Ces trois protéines peuvent jouer





un rôle important dans le contrôle de la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leur fonctionnement peut avoir de sérieuses conséquences sur la charge énergétique de la cellule.

L'interaction entre chloroplastes et mitochondries se fait par l'intermédiaire de divers processus impliquant notamment une régulation des processus énergétiques et le contrôle cellulaire de la balance redox (pour une revue récente sur le sujet voir Nunes-Nesi, Araújo, & Fernie, 2011). L'un des exemples pour illustrer cette interaction est la participation de ces deux organites dans la fourniture de pouvoir réducteur (NADH) utilisé dans les peroxysomes pour la réduction de l'hydroxypyruvate en glycérate au cours du cycle photorespiratoire (Duttilleul et al., 2003; Igamberdiev, Bykova, Lea, & Gardeström, 2001). L'interaction entre ces deux organites, implique une signalisation spécifique avec des composés redox, des substrats organiques, intermédiaires entre les processus anaboliques (photosynthèse) et les processus cataboliques (respiration), ainsi que la participation de systèmes découplant les processus oxydatifs de la synthèse d'énergie tels que les NAD(P) déshydrogénases, l'alternative oxydase (AOX), la protéine découplante des plantes (pUCP) et l'oxydase terminale des plastes (PTOX).

Afin d'étudier l'implication de ces trois marqueurs protéiques (AOX, pUCP et PTOX) comme éventuels marqueurs de tolérance, une expérimentation a d'abord été menée pour apprécier les différences de tolérance à la sécheresse et/ou l'ozone de deux cultivars de *Vigna unguiculata* : le cultivar EPACE et le cultivar 1183. Le choix de ces deux cultivars a été dicté par leur comportement dans des travaux précédents (Torres-Franklin et al., 2007) qui avaient permis de différencier le cultivar EPACE comme tolérant à la sécheresse alors que le cultivar 1183 était donné comme sensible. Dans nos conditions expérimentales, les deux cultivars se sont très peu différenciés vis-à-vis de la sécheresse, même si des signes de stress oxydant (coloration au DAB, révélateur de la présence de peroxyde d'hydrogène) étaient



plus marqués pour le cultivar 1183 sous sécheresse et contrainte combinée (sécheresse + O<sub>3</sub>) ainsi qu'une plus forte diminution des performances photosynthétiques (diminution de l'efficacité du PSII, plus fort quenching non-photochimique). Les différences entre les deux cultivars semblent par contre plus marquées en réponse au traitement ozone et ceci pourrait être la conséquence d'un influx plus important d'O<sub>3</sub> dans les feuilles (valeurs de POD<sub>0</sub>). Les résultats concernant le système antioxydant (ascorbate et glutathion), ont montré que l'augmentation des teneurs en ascorbate sous sécheresse et sécheresse combinée à l'O<sub>3</sub> (14 jours) n'était pas apparemment capable de prévenir la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les feuilles du cultivar (1183). Pour les deux cultivars des teneurs plus élevées en glutathion dans les différentes conditions de stress pourraient suggérer que le glutathion ait un rôle dans la prévention de la production de ROS dans les feuilles. Il est à noter que 1183, cultivar plus sensible à l'ozone, se différencie du cultivar EPACE par de plus faibles teneurs en glutathion à 14 jours de traitement O<sub>3</sub>. Il n'en demeure pas moins que les différences restent minimales entre les deux cultivars quelle que soit la contrainte appliquée. Sans doute, la recherche d'une réponse plus tranchée entre cultivars nécessiterait de nouvelles investigations avec un plus grand nombre de cultivars dans la perspective de valider des traits adaptatifs à l'une ou l'autre des contraintes. Par ailleurs, il convient également de noter pour l'ensemble des caractères étudiés, le peu de différence obtenue entre le traitement sécheresse et la combinaison sécheresse et O<sub>3</sub>. Notre expérimentation a clairement montré que l'impact sécheresse conditionne fortement la réponse de la plante et ceci malgré un influx important d'O<sub>3</sub> dans la feuille. Il serait intéressant de montrer si des résultats similaires sont observés lorsque la contrainte O<sub>3</sub> est appliquée avant la sécheresse. Cette situation, probable dans des conditions naturelles, pourrait conduire à modifier la réponse des stomates à la sécheresse et/ou la capacité antioxydante des cellules et mettre ainsi en évidence un impact éventuel de la contrainte O<sub>3</sub> sur la réponse des plantes à la sécheresse (Wilkinson & Davies, 2009).



Dans la seconde partie de mon travail, nous avons retenu le cultivar EPACE pour étudier les éventuelles modifications d'expression des gènes codant pour les protéines découplantes mitochondriales (AOX, pUCP) et chloroplastique (PTOX). Sur un temps court il est apparu que ces trois protéines avaient leurs gènes exprimés plus fortement pour tous les traitements. Pour un temps plus long les réponses sont apparues différentes suivant la contrainte appliquée. Il est difficile de conclure à des différences de sensibilité des organites cellulaires. Néanmoins, nous pouvons conclure que seule la sécheresse sur un long terme est susceptible de modifier l'expression de la PTOX. Cette plus forte expression de cette enzyme chloroplastique pourrait limiter l'augmentation de la charge oxydante dans le chloroplaste, associée avec un dysfonctionnement du transfert d'électrons photochimique. Sous O<sub>3</sub> les modifications d'expression touchent préférentiellement sur un long terme la mitochondrie et l'augmentation concomitante de l'expression de l'AOX (principalement *VuAOX1*) et de la pUCP (*VuUCP1b*) peuvent apparaître comme le moyen d'éviter des conditions oxydantes dans cet organite et le déclenchement d'un processus de mort cellulaire. Comme nous l'avons observé pour plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques, la situation de combinaison des contraintes est très nettement marquée d'une signature sécheresse. L'augmentation des gènes codants pour la PTOX et la pUCP montre l'importance que peut avoir ces protéines pour limiter le stress oxydant dans la mitochondrie et le chloroplaste, respectivement, alors que l'expression de l'AOX n'est pas modifiée.

Globalement, nos résultats suggèrent que les différentes réponses des deux cultivars peuvent être attribuées à une régulation différentielle du métabolisme énergétique ainsi qu'à une réponse nettement distincte concernant les teneurs en antioxydants cellulaires. L'étude de l'expression des gènes codant pour les protéines découplantes de la mitochondrie (AOX et pUCP) et du chloroplaste



(PTOX) a montré que le déclenchement de la cascade de réponse à la sécheresse entraîne des modifications du métabolisme énergétique qui confèrent une prévention plus efficace au stress  $O_3$  lorsque les deux contraintes sont appliquées simultanément. D'après l'analyse d'expression des gènes codant pour les différentes protéines, les protéines impliquées seraient la PTOX, dans les chloroplastes, et la pUCP, dans les mitochondries. Sous ozone, l'AOX et en particulier le gène *VuAOX1* semble être plus important pour l'évitement du stress oxydatif dans le mitochondrie.

Les observations réalisées et les résultats acquis au cours de cette étude nous amènent à identifier deux grands thèmes de recherche intéressants à développer dans le cadre global d'une meilleure compréhension de la réponse des plantes aux stress causés par la sécheresse, par l' $O_3$  ainsi que la combinaison de la sécheresse avec l' $O_3$ .

- La régulation des protéines découplantes de la mitochondrie et du chloroplaste comme mécanisme de prévention de formation de ROS
- La régulation des systèmes antioxydants comme ligne de défense primaire aux ROS.

Il est bien connu que le métabolisme énergétique chez les plantes engage la participation des deux organites cellulaires (mitochondrie et chloroplaste) impliqués dans la synthèse d'ATP. Dans des conditions de contraintes environnementales, ces organites doivent jouer un rôle important afin d'établir une reprogrammation permettant d'atteindre un nouvel état d'homéostasie cellulaire. Dans le cadre du métabolisme énergétique, il reste à montrer que les modifications d'expression des différents gènes étudiés correspondent à des modifications *in vivo* du fonctionnement des protéines. Des études menées sur la quantification de protéines découplantes ainsi que la mesure de l'activité de ces protéines *in vivo* (méthode isotopique) et dans les organites isolés doivent être entreprises. Ce travail ouvre ainsi des perspectives sur une étude qui intégrerait les modifications relatives de





transcrits aux modifications d'activité des organites isolés et de la feuille entière. Nous avons amorcé dans ce travail de thèse une telle démarche avec la quantification de l'AOX mais ces résultats restent préliminaires. Cependant, pour l'AOX la quantité de protéine semble suivre le même profil que l'expression des gènes (notamment *VuAOX1*) avec une plus forte quantité sous O<sub>3</sub> appliqué seul. L'utilisation d'anticorps dirigés contre la PTOX est en cours. Précisons que les voies de signalisation sous ozone et sous sécheresse induisant une modification d'expression des gènes codant pour ces trois protéines restent à découvrir. On peut s'interroger si la signalisation lipidique est impliquée et se pencher sur l'éventuelle implication de la signalisation rétrograde (organite-noyau) dans le contrôle des mécanismes de réponse de la plante à la contrainte hydrique et à l'ozone.

Le deuxième thème émergent de recherches pour la compréhension de la réponse adaptative des plantes aux stress sécheresse et ozone est la compréhension des mécanismes de défense antioxydante. Les rôles de l'ascorbate et du glutathion dans cette défense sont indéniables, mais leur implication (sous la forme oxydée ou réduite), leur biosynthèse ainsi que la régulation des protéines qui participent à leur métabolisme nécessitent encore des travaux. Au final, l'implication des ROS comme molécules de signalisation dans les cellules restent à préciser dans nos conditions de contrainte. Plusieurs travaux ont déjà présenté le rôle de divers ROS ou RNS (espèces réactives de l'azote) dans la réponse à l'ozone ou à la sécheresse mais les possibles interactions entre ces voies de signalisation restent encore à préciser dans des situations de combinaison de contraintes.



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



## 8- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdeen, A., Schnell, J., & Miki, B. (2010). Transcriptome analysis reveals absence of unintended effects in drought-tolerant transgenic plants overexpressing the transcription factor. *BMC Genomics*, (11), 69–90.
- Affourtit, C., Albury, M. S., Crichton, P. G., & Moore, A. L. (2002). Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS letters*, 510(3), 121–6.
- Aluru, M., & Rodermel, S. (2004). Control of chloroplast redox by the IMMUTANS terminal oxidase. *Physiologia Plantarum*, 120, 4–11.
- Aluru, M., Bae, H., Wu, D., & Rodermel, S. R. (2001). The Arabidopsis immutans mutation affects plastid differentiation and the morphogenesis of white and green sectors in variegated plants. *Plant physiology*, 127(1), 67–77.
- Alves, E.S., Moura, B.B., Pedroso, A.N.V., Tresmondi, F., Domingos, M. (2011) The efficiency of tobacco Bel-W3 and native species for ozone biomonitoring in subtropical climate, as revealed by histo-cytochemical techniques. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*.159(12), 3309–15.
- Andersson, M. E., & Nordlund, P. (1999). A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS letters*, 449(1), 17–22.
- Andrade-Júnior, A. S., Santos, A. A. dos, Sobrinhos, C. A., Bastos, E. A., Melo, F. de B., Viana, F. M. P., Filho, F. R. F., et al. (2002). Cultivo de Feijão-Caupi. *Embrapa*. Retrieved March 9, 2012, from <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/importancia.htm>
- Araújo, J. P. P., & Watt, E. E. (1988). *O caupi no Brasil*. Brasília: EMBRAPA/CNPAP.
- Archibald, J. M., Rogers, M. B., Toop, M., Ishida, K.-I., & Keeling, P. J. (2003). Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigeloviella natans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7678–83.
- Arnholdt-Schmitt, B., Costa, J. H., & de Melo, D. F. (2006). AOX - a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *Trends in plant science*, 11(6), 281–7.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 50, 601–639.
- Ashmore, M. R. (2005). Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment*, 28(8), 949–964.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523–43.
- Atteia, A., van Lis, R., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. ., Martin, W., & Henze, K. (2004). Identification of prokaryotic homologues indicates an endosymbiotic origin for the alternative oxidases of mitochondria (AOX) and chloroplasts (PTOX). *Gene*, 330(null), 143–148.
- Azzu, V., Jastroch, M., Divakaruni, A. S., & Brand, M. D. (2010). The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1797, 785–791.
- Bagard, M., Thiec, D. L., Delacote, E., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Banvoy, J., Gérard, J., Dizengremel, P., et al. (2008). Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiologia Plantarum*, 559–574.
- Baker, N. R., & Rosenquist, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1607–1621.



- Bartoli, C.G., Gomez, F., Gergoff, G., Guiamét, J.J., Puntarulo, S. (2005) Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of experimental botany*.56(415), 1269–76.
- Begcy, K., Mariano, E.D., Mattiello, L., Nunes, A.V., Mazzafera, P., Maia, I.G., Menossi, M. (2011) An Arabidopsis mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. *PloS one*. 6(8), e23776.
- Bennoun, P. (1982). Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(14), 4352–6.
- Bennoun, P. (2002). The present model for chlororespiration. *Photosynth. Res.*, 73, 273–277.
- Berthold, D. A., Andersson, M. E., & Nordlund, P. (2000). New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1460(2-3), 241–254.
- Bielski, B.H.J., Arudi, R.L., Sutherland, M.W. (1982) A Study of the Reactivity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with Unsaturated Fatty Acids. *The Journal of biological chemistry*.258(8), 4759–4761.
- Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. a, Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of biological chemistry*, 282(2), 1183–92.
- Blum, A. (2011). Drought resistance - is it really a complex trait? *Functional Plant Biology*, 38(10), 753.
- Bohnert, H. J., & Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water- stress tolerance in plants. *Trends in Biotech*, 14(March), 89–97.
- Borecký, J, Maia, I. G., Costa, A. D., Jezek, P., Chaimovich, H., de Andrade, P. B., Vercesi, A. E., et al. (2001). Functional reconstitution of Arabidopsis thaliana plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in Escherichia coli. *FEBS letters*, 505(2), 240–4.
- Borecký, Jirí, & Vercesi, A. E. (2005). Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. *Bioscience reports*, 25(3-4), 271–86. doi:10.1007/s10540-005-2889-2
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., et al. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS letters*, 408(1), 39–42.
- Bouillaud, F., Arechaga, I., Petit, P. X., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Casteilla, L., Laurent, M., et al. (1994). A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. *The EMBO journal*, 13(8), 1990–7.
- Büchel, C., & Garab, G. (1995). Evidence for the operation of a cyanide-sensitive oxidase in chlororespiration in the thylakoids of the chlorophyll c-containing alga *Pleurochloris meiringensis* (Xanthophyceae). *Planta*, 197(1). doi:10.1007/BF00239941
- Carol, P., & Kuntz, M. (2001). A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends in plant science*, 6(1), 31–36.
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G., et al. (1999). Mutations in the Arabidopsis Gene IMMUTANS Cause a Variegated Phenotype by Inactivating a Chloroplast Terminal Oxidase Associated with Phytoene Desaturation. *The Plant Cell*, 11(January), 57–68.
- Caruso, A., Cheddor, F., Carpin, S., Depierreux, C., Delmotte, F. M., Kahlem, G., & Morabito, D. (2008). Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165(9), 932–941.
- Cavalheiro, R. A., Fortes, F., Borecký, J., Faustini, V. C., & Schreiber, A. Z. (2004). Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(10), 1455–1461. doi:10.1590/S0100-879X2004001000003





- Chaudhuri, M., & Hill, G. C. (1996). Cloning, sequencing, and functional activity of the *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83(1), 125–129.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Review: Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant, 239–264.
- Chen, X., Laudeman, T.W., Rushton, P.J., Spraggins, T. a, Timko, M.P. (2007) CGKB: an annotation knowledge base for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) methylation filtered genomic genespace sequences. *BMC Bioinformatics*. 8, 129.
- Chien, L.-F., Wu, Y.-C., & Chen, H.-P. (2011). Mitochondrial energy metabolism in young bamboo rhizomes from *Bambusa oldhamii* and *Phyllostachys edulis* during shooting stage. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale*, 49(4), 449–57.
- Clifton, R., Millar, A. H., & Whelan, J. (2006). Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica et biophysica acta*, 1757(7), 730–41.
- Conklin, P. L., & Barth, C. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment*, 27(8), 959–970.
- Considine, M. J., Daley, D. O., & Whelan, J. (2001). The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant physiology*, 126(4), 1619–29.
- Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M. L., Cruz DE Carvalho, M. H., D'Arcy-Lameta, A., & Zuily-Fodil, Y. (2006). Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. *Annals of botany*, 98(6), 1279–87.
- Costa, J. H., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Pham-Thi, A. T., Silva Lima, M. D. G., Dizengremel, P., Jolivet, Y., & Fernandes de Melo, D. (2004). Identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. of two cDNAs encoding mitochondrial alternative oxidase orthologous to soybean alternative oxidase genes 2a and 2b. *Plant Science*, 167(2), 233–239.
- Costa, J. H., Jolivet, Y., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Orellano, E. G., da Guia Silva Lima, M., Dizengremel, P., & Fernandes de Melo, D. (2007). Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought/salt tolerance. *Journal of plant physiology*, 164(6), 718–27.
- Costa, J. H., Mota, E. F., Cambursano, M. V., Lauxmann, M. A., de Oliveira, L. M. N., Silva Lima, M. D. G., Orellano, E. G., et al. (2010). Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (*VuAox1* and *2b*) genes in *Vigna unguiculata*. *Journal of plant physiology*, 167(7), 561–70.
- Cournac, L., Josse, E., Joe, T., Rumeau, D., Redding, K., Kuntz, M., Peltier, G. (2000) Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration.
- Cournac, L., Latouche, G., Cerovic, Z., Redding, K., Ravenel, J., & Peltier, G. (2002). In Vivo Interactions between Photosynthesis , Mitorespiration , and Chlororespiration in *Chlamydomonas reinhardtii*, 129(August), 1921–1928.
- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E., Kuntz, M., & Peltier, G. (2000). Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *The Journal of biological chemistry*, 275(23), 17256–62.
- Creelman, R. a, Mulpuri, R. (2002) The oxylipin pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*.1, e0012.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 156–65.
- 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 and Environment*, 28(5), 623–632.



- Dafré-Martinelli, M., Nakazato, R. K., Dias, A. P. L., Rinaldi, M. C. S., & Domingos, M. (2011). The redox state of *Ipomoea nil* "Scarlet O'Hara" growing under ozone in a subtropical area. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(6), 1645–52.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 57(5), 779–95.
- Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2010). The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflugers Arch.*, 459(2), 269–275.
- Dietz, K.-J. (2003). Plant peroxiredoxins. *Annual review of plant biology*, 54, 93–107. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134934
- Divakaruni, A. S., & Brand, M. D. (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 26(3), 192–205.
- Dizengremel, P. (2001). Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(9), 14.
- Dizengremel, P., Thiec, D. L., Bagard, M., & Jolivet, Y. (2008). Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution*, 156, 11–15. doi:10.1016/j.envpol.2007.12.024
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chétrit, P., Foyer, C. H., & Paepe, R. D. (2003). Leaf Mitochondria Modulate Whole Cell Redox Homeostasis, Set Antioxidant Capacity, and Determine Stress Resistance through Altered Signaling and Diurnal Regulation. *Society*, 15(May), 1212–1226.
- 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(2), 595–608.
- Ehlers, J. D., & Hall, A. E. (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Field Crops Research*, 53, 187–204.
- El Maarouf, H., Zuily-Fodil, Y., Gareil, M., d' Arcy-Lameta, A., & Pham-Thi, A. T. (1999). Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp. differing in drought tolerance. *Plant molecular biology*, 39(6), 1257–65.
- Feild, T., Nedbal, L., & Ort, D. (1998). Nonphotochemical reduction of the plastoquinone pool in sunflower leaves originates from chlororespiration. *Plant physiology*, 116(4), 1209–18.
- Fernandes de Melo, D., Jolivet, Y., Façanha, A. R., Gomes Filho, E., Silva Lima, M., & Dizengremel, P. (1994). Effect of salt stress on mitochondrial energy metabolism of *Vigna unguiculata* cultivars differing in NaCl tolerance. *Plant Physiology et Biochemistry*, 32(3), 405–412.
- Fery, R. (2002). Development of improved southernpea varieties for the southern United States: An update on the USDA effort. *Vegetable Association Yearbook (North Carolina Vegetable Growers Association)*, 53.
- Figueira, T.R.S., Arruda, P. (2011) Differential expression of uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase in the plant response to stress. *Journal of bioenergetics and biomembranes*.43(1), 67–70.
- Finnegan, P. M., Whelan, J., Millar, a H., Zhang, Q., Smith, M. K., Wiskich, J. T., & Day, D. a. (1997). Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase. *Plant physiology*, 114(2), 455–66.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., et al. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature genetics*, 15(3), 269–72.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1), 2–18.
- Fu, A., Aluru, M., Rodermeil, S. (2009) Conserved Active Site Sequences in Arabidopsis Plastid Terminal Oxidase ( PTOX ). *Journal of Biological Chemistry*.284(34), 22625–22632.



- Fu, A., Liu, H., Yu, F., Kambakam, S., Luan, S., Rodermel, S. (2012) Alternative oxidases (AOX1a and AOX2) can functionally substitute for plastid terminal oxidase in *Arabidopsis* chloroplasts. *The Plant cell*.24(4), 1579–95.
- Fu, A., Park, S., Rodermel, S. (2005) Sequences Required for the Activity of PTOX ( IMMUTANS ), a Plastid Terminal Oxidase IN VITRO AND IN PLANTA MUTAGENESIS OF IRON-BINDING SITES AND A CONSERVED SEQUENCE THAT CORRESPONDS TO EXON 8 \*. *JournalofBiologicalChemistry*. 280(52), 42489 –42496.
- Garantizado, F.E.A., Costa, J.H., Maia, I.D., Fernandes de Melo, D. (2011) Expressão diferencial dos genes *VuUCP1a* e *VuUCP1b* em caupi sob estresse salino. , 404–408.
- Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990(1), 87–92.
- Gfeller, R. P., & Gibbs, M. (1985). Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Role of Plastoquinone. *Plant physiology*, 77(2), 509–11.
- Godde, D., & Trebst, A. (1980). NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Archives of Microbiology*, 127(3), 245–252.
- Gomes, C. M., Gall, J. L., Xavier, A. V., & Teixeira, M. (2001). Could a diiron-containing four-helix-bundle protein have been a primitive oxygen reductase? *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 2(7-8), 583 – 7.
- Grene, R. (2002). Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *The Arabidopsis book* (American S., Vol. 1, pp. 1–20). American Society of Plant Biologists. doi:10.1199/tab.0036.1
- Ground-level ozone in the 21st century: future trends , impacts and policy implications. Science Policy Report 15/08.* (2008).
- Hall, A. E. (2004). Breeding for adaptation to drought and heat in cowpea. *European Journal of Agronomy*, 21(4), 447–454.
- Hansen, L. D., Church, J. N., Matheson, S., McCarlie, V. W., Thygeson, T., Criddle, R. S., & Smith, B. N. (2002). Kinetics of plant growth and metabolism. *Thermochimica Acta*, 388(1-2), 415–425.
- Heath, R. L., & Taylor, G. E. (1997). Physiological Processes and Plant Responses to Ozone Exposure. In H. Sandermann, A. R. Wellburn, & R. L. Heath (Eds.), *Forest Decline and Ozone* (pp. 317–398). doi:10.1007/978-3-642-59233-1\_10
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604–611.
- Hose, E., Steudle, E., & Hartung, W. (2000). Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes. *Planta*, 211(6), 874–882.
- Hourton-Cabassa, C., Rita Matos, A., Zachowski, A., & Moreau, F. (2004). The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondria. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 42(4), 283–90. doi:10.1016/j.plaphy.2004.01.007
- Hughes, J., & Criscuolo, F. (2008). Evolutionary history of the UCP gene family: gene duplication and selection. *BMC evolutionary biology*, 8, 306.
- Ibáñez, H., Ballester, A., Muñoz, R., & Quiles, M. J. (2010). Chlororespiration and tolerance to drought, heat and high illumination. *Journal of plant physiology*, 167(9), 732–8.
- IBGE. (2001). *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Rio de Janeiro.
- Igamberdiev, A. U., Bykova, N. V., Lea, P. J., & Gardeström, P. (2001). The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: A study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. *Physiologia plantarum*, 111(4), 427–438.
- Ingram, J., & Bartels, D. (1996). the Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 47, 377–403.



- Iqbal, A., Khalil, I. a., Ateeq, N., & Sayyar Khan, M. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97(2), 331–335.
- Ito-Inaba, Y., Hida, Y., & Inaba, T. (2009). What is critical for plant thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages. *Planta*, 231(1), 121–30.
- Jarmuszkiewicz, W, Sluse-Goffart, C. M., Hryniewiecka, L., & Sluse, F. E. (1999). Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *The Journal of biological chemistry*, 274(33), 23198–202.
- Jarmuszkiewicz, Wieslawa, Behrendt, M., Navet, R., & Sluse, F. E. (2002). Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development. *FEBS letters*, 532(3), 459–64.
- Jenkin, M. E., & Clemitshaw, K. C. (2000). Ozone and other secondary photochemical pollutants: chemical processes governing their formation in the planetary boundary layer. *Atmospheric environment*, 34(16), 2499–2527.
- Jiang, M., & Zhang, J. (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2401–2410.
- Jiménez, A., Hernandez, J. A., Del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1997). Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant physiology*, 114(1), 275–284.
- Johnson, G. N. (2005). Cyclic electron transport in C 3 plants: fact or artefact? *interactions*, 56(411), 407–416.
- Josse, E.-M., Alcaraz, J.-P., Laboure, A.-M., & Kuntz, M. (2003). In vitro characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX). *European Journal of Biochemistry*, 270(18), 3787–3794.
- Josse, E., Simkin, A. J., Gaffé, J., Labouré, a M., Kuntz, M., & Carol, P. (2000). A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiology*, 123(4), 1427–1436.
- Kaneko, T. (2001). Complete Genomic Sequence of the Filamentous Nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Research*, 8(5), 205–213. doi:10.1093/dnares/8.5.205
- Kangasjärvi, J., Jaspers, P., & Kollist, H. (2005). Signalling and cell death in ozone-exposed plants, (1), 1021–1036.
- Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., Karjalainen, R. (1994) Plant defense systems induced by ozone. *Plant Cell Environment*.17, 783–794.
- Klingenberg, M. (1990). Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends in biochemical sciences*, 15(3), 108–12.
- Kong, J., Gong, J.-M., Zhang, Z.-G., Zhang, J.-S., & Chen, S.-Y. (2003). A new AOX homologous gene OsIM1 from rice (*Oryza sativa* L.) with an alternative splicing mechanism under salt stress. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 107(2), 326–31. doi:10.1007/s00122-003-1250-z
- Kooten, O. van, & Snel, J. F. H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25, 147–150.
- Kreps, J. A., Wu, Y., Chang, H., Zhu, T., Wang, X., Harper, J. F., Mesa, T., et al. (2002). Transcriptome Changes for *Arabidopsis* in Response to Salt , Osmotic , and Cold Stress 1 [ w ], 130(December), 2129–2141.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*.9(4), 299–306.
- Kuntz, M. (2004) Plastid terminal oxidase and its biological significance. *Planta*. 218(6), 896–9.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.





- Laloi, M. (1999). Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 56(11-12), 918–44.
- Lambers, H. (1982). Cyanide-resistant respiration: A non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiologia Plantarum*, 55(4), 478–485.
- Lance, C., Chauveau, M., & Dizengremel, P. (1985). The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria. In R. Douce & D. A. Day (Eds.), *Higher plant cell respiration*. Berlin: Springer Verlag.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*.23(21), 2947–8.
- Lee, B., & Wang, J. (2006). Concentration variation of isoprene and its implications for peak ozone concentration. *Atmospheric Environment*, 40(28), 5486–5495. doi:10.1016/j.atmosenv.2006.03.035
- Lee, D. S., Köler, I., Grobler, E., Rohrer, F., Sausen, R., Gallardo-Klenner, L., Olivier, J. G. J., et al. (1997). Estimations of global NO<sub>x</sub> emissions and their uncertainties. *Atmospheric environment*, 31(12), 1735–1749.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T., & Wurtzel, E. T. (2008). The Maize Phytoene Synthase Gene Family: Overlapping Roles for Carotenogenesis in Endosperm, Photomorphogenesis, and Thermal Stress Tolerance. *Plant Physiology*, 147(July), 1334–1346.
- Lima-Júnior, A., Fernandes, D., Melo, D., Hélio, J., Graciela, E., & Jolivet, Y. (2000). Effect of pH on CN-resistant respiratory activity and regulation on *Vigna unguiculata* mitochondria. *Plant Physiology et Biochemistry*, 38, 765–771.
- Mackenzie, S., & McIntosh, L. (1999). Higher plant mitochondria. *The Plant cell*, 11(4), 571–86.
- Mailloux, R. J., & Harper, M.-E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free radical biology & medicine*, 51(6), 1106–15.
- Maione, T. E., & Gibbs, M. (1986). Hydrogenase-Mediated Activities in Isolated Chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, 80(2), 360–3.
- Matyssek, R., Le Thiec, D., Löw, M., Dizengremel, P, Nunn, a J., Häberle, K.-H. (2006) Interactions between drought and O<sub>3</sub> stress in forest trees. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*.8(1), 11–7.
- Maxwell, D. P., Wang, Y., & McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8271–8276.
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence — a practical guide, 51(345), 659–668.
- McDonald, A. E. (2008). Alternative oxidase: an inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed “cyanide-resistant” terminal oxidase. *Functional Plant Biology*, 35(7), 535. doi:10.1071/FP08025
- McDonald, A. E., & Vanlerberghe, G. C. (2006). Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Biochemistry*, 1, 357 – 364.
- McDonald, A.E., Ivanov, Alex G, Bode, R., Maxwell, Denis P, Rodermeel, S., Hüner, N.P. a (2011) Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochimicaetbiophysicaacta*. 1807(8), 954–67.
- Meeuse, B. J. D. (1975). Thermogenic Respiration in Aroids. *Annual Review of Plant Physiology*, 26(1), 117–126.
- Mills, G, Buse, A., Gimeno, B., Bermejo, V, Holland, M. (2007) A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. . 41, 2630–2643.
- Mills, G., Pleijel, H., Büker, P., Braun, S., Emberson, L., Harmens, H., Simpson, D., et al. (2011). Chapter 3: Mapping Critical Levels for Vegetation Recent. *Mapping Manual 2004* (pp. 0–114).
- Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature*, 191(4784), 144–148. doi:10.1038/191144a0



- Mittler, R. (2002). Oxidative stress , antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405–410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490–8. doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., et al. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science*, 16(6), 300–9.
- Moore, A. L., & Siedow, J. N. (1991). The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1059, 121–140.
- Moore, A. L., Albury, M. S., Crichton, P. G., & Affourtit, C. (2002). Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends in plant science*, 7(11), 478–81.
- Moore, A. L., Umbach, A. L., & Siedow, J. N. (1995). Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: A model of the active site. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 27(4), 367–377.
- Morgan, P. B., Ainsworth, E. A., & Long, S. P. (2003). How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield. *Plant, Cell and Environment*, 26(8), 1317–1328.
- Morgan, P. B., Mies, T. A., Bollero, G. A., Nelson, R. L., & Long, S. P. (2005). Season-long elevation of ozone concentration to projected 2050 levels under fully open-air conditions substantially decreases the growth and production of soybean. *New Phytologist*, 2050. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01679.x
- Morgan, P.B., Ainsworth, E.A., Long, S P (2003) How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield.*Plant, Cell and Environment*.26(8), 1317–1328.
- Munns, R., & Sharp, R. (1993). Involvement of Abscisic Acid in Controlling Plant Growth in Soil of Low Water Potential. *Australian Journal of Plant Physiology*, 20(5), 425.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Mimuro, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., Sasamoto, S., et al. (2003). Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 10(4), 137–45.
- Nicholls, D. G., & Rial, E. (1999). A history of the first uncoupling protein, UCP1. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 31(5), 399–406.
- Nixon, P. J. (2000). Chlororespiration. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355(1402), 1541–7. doi:10.1098/rstb.2000.0714
- Niyogi, K. K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 3(6), 455–60.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., et al. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment*, 35(2), 454–84.
- Nunes-Nesi, A., Araújo, W. L., & Fernie, A. R. (2011). Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. *Plant physiology*, 155(1), 101–7.
- Pääkkönen, E., Metsärinne, S., Holopainen, T., & Kärenlampi, L. (1996). The ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*) in relation to the developmental stage of leaves. *New Phytologist*, 132(1), 145–154.
- Palmieri, L., Picault, N., Arrigoni, R., Besin, E., Palmieri, F., & Hodges, M. (2008). Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *The Biochemical journal*, 410(3), 621–9.
- Parent, B., Hachez, C., Redondo, E., Simonneau, T., Chaumont, F., & Tardieu, F. (2009). Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant physiology*, 149(4), 2000–12.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M.N., Fonzo, N.D., Flagella, Z. (2007) Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress A case study: durum wheat mitochondria. . 58(2), 195–210.



- Paterson, A. H. (2006). Leafing through the genomes of our major crop plants: strategies for capturing unique information. *Nature reviews. Genetics*, 7(3), 174–84.
- Pell, E. J., Schlagnhauser, C. D., & Arteca, R. N. (1997). Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 264–273.
- Peltier, G., & Cournac, L. (2002a). Chlororespiration. *Annual review of plant biology*, 53, 523–550.
- Peltier, G., Ravenel, J., & Verméglio, A. (1987). Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas*: Evidence for a chlororespiration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 893(1), 83–90.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*. 8(10), 785–6.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.
- Pottorff, M., Wanamaker, S., Ma, Y. Q., Ehlers, J. D., Roberts, P. a, & Close, T. J. (2012). Genetic and Physical Mapping of Candidate Genes for Resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* Race 3 in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *PLoS one*, 7(7), e41600.
- Purvis, A. C. (1997). Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 100(1), 165–170.
- Purvis, A. C., & Shewfelt, R. L. (1993). Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiologia Plantarum*, 88(4), 712–718.
- Queval, G., & Noctor, G. (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Analytical Biochemistry*, 363(1), 58–69.
- Quin, F. M. (1997). Introduction. In B. B. Sing, D. R. Mohan Raj, K. E. Dashiell, & L. E. N. Jackai (Eds.), *Advances in cowpea research* (Ibadan: II., p. ix–xv).
- Raghavendra, A.S., Padmasree, K. (2003) Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends in Plant Science*.8(11), 546–553.
- Rao, M. V., & Davis, K. R. (2001). The physiology of ozone induced cell death. *Planta*, 213(5), 682–90.
- Renaut, J., Bohler, S., Hoffmann, L., Sergeant, K., Ahsan, N., Jolivet, Y., Dizengremel, P., et al. (2009). The Impact of atmospheric composition on plants: A case study of ozone and poplar. *Mass Spectrometry Reviews*, 28, 495–516.
- Reynolds, M. P., & Ortiz, R. (2010). Climate change and crop production. In M. P. Reynolds (Ed.), *CABI Climate Change Series*. Wallingford: Cabi.
- Ricquier, D., & Kader, J.-C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 73(3), 577–583.
- Röbelen, G. (1968). Genbedingte Rotlicht-Empfindlichkeit der Chloroplastendifferenzierung bei Arabidopsis. *Planta*, 80(3), 237–254. doi:10.1007/BF00392394
- Roberts, C. W., Roberts, F., Henriquez, F. L., Akiyoshi, D., Samuel, B. U., Richards, T. A., Milhous, W., et al. (2004). Evidence for mitochondrial-derived alternative oxidase in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: a potential anti-microbial agent target. *International Journal for Parasitology*, 34(3), 297–308.
- Rocap, G., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N. A., Arellano, A., et al. (2003). Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424(6952), 1042–7.
- Rockström, J., & Falkenmark, M. (2000). Semiarid Crop Production from a Hydrological Perspective: Gap between Potential and Actual Yields. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(4), 28.
- Rosso, D., Ivanov, A. G., Fu, A., Geisler-lee, J., Hendrickson, L., Geisler, M., Stewart, G., et al. (2006). IMMUTANS does not act as a stress-induced safety valve in the protection of the photosynthetic apparatus of Arabidopsis during steady-state photosynthesis. *Plant physiology*, 142, 574–585.



- Rowland, F. S. (2006). Stratospheric ozone depletion. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1469), 769–90.
- Royal Society (2008) *Ground-level ozone in the 21st century: future trends , impacts and policy implications. Science Policy Report 15/08.*
- Rumeau, D., Peltier, G., & Cournac, L. (2007). Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Environment*, 1041–1051.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., et al. (2003) TM4: A Free, Open-Source System for Microarray Data Management and Analysis. *BioTechniques*. 34(2), 374–377.
- Sazanov, L. A., Burrows, P. A., & Nixon, P. J. (1998). The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 1319–24.
- Scherer, S. (1990). Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins? *Trends in Biochemical Sciences*, 15(12), 458–462.
- Siedow, J. N., Umbach, A. L., & Moore, A. L. (1995). The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS letters*, 362(1), 10–4.
- Simmonds, P. G., Derwent, R. G., Manning, a. L., & Spain, G. (2004). Significant growth in surface ozone at Mace Head, Ireland, 1987–2003. *Atmospheric Environment*, 38(28), 4769–4778.
- Singh, B. B., & Tarawali, S. A. (1997). Cowpea and its improvement: Key to sustainable mixed crop/livestock farming systems in West Africa. In C. Renard (Ed.), *Crop residues in sustainable mixed crop/livestock farming system* (pp. 79–100). Wallingford, UK: ICRISAT/ILRI/CABI.
- Singh, S. K., & Raja Reddy, K. (2011). Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 105(1), 40–50.
- Skulachev, V. P. (1999). Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 31(5), 431–45.
- Smith, J. A. C., & Griffiths, H. (1993). *Water Deficits: Plant Responses from Cell to Community* (p. 364). Lancaster: Bios Scientific Publishers.
- Stanford, N. P., Santos, D. R., Silva, V. M., Santos, C. E. R. , & Monteiro, M. C. (1990). Fixação do N<sub>2</sub> e matéria seca do caupi em dois solos do semi-árido brasileiro submetidos à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 14, 283–290.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Pérez-Brocal, V., Gaston, D., Richmond, G. S., van der Giezen, M., Clark, C. G., et al. (2008). Organelles in Blastocystis that Blur the Distinction between Mitochondria and Hydrogenosomes. *Current Biology*, 18(8), 580–585. doi:10.1016/j.cub.2008.03.037
- Stenmark, P., & Nordlund, P. (2003). A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. *FEBS Letters*, 552(2-3), 189–192. doi:10.1016/S0014-5793(03)00920-7
- Stepien, P., & Johnson, G. N. (2009). Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *thellungiella*: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant physiology*, 149(2), 1154–65.
- Strohm, M., Eiblmeier, M., Langebartels, C., Jouanin, L., Polle, a., Sandermann, H., & Rennenberg, H. (1999). Responses of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase or glutathione reductase to acute ozone stress: visible injury and leaf gas exchange. *Journal of Experimental Botany*, 50(332), 365–374.
- Sun, X., Wen, T. (2011) Physiological roles of plastid terminal oxidase in plant stress responses. *Journal of Biosciences*.36(5), 951–956.
- Suzuki, T., Hashimoto, T., Yabu, Y., Kido, Y., Sakamoto, K., Nihei, C., Hato, M., et al. (2004). Direct evidence for cyanide-insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite





- Cryptosporidium parvum: phylogenetic and therapeutic implications. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 1044–1052.
- Sweetlove, L.J., Lytovchenko, A., Morgan, M., Nunes-Nesi, A., Taylor, N.L., Baxter, C.J., Eickmeier, I., Fernie, A.R. (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(51), 19587–92.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2004). *Fisiologia vegetal*. (Artmed, Ed.) (Terceira E., p. 719). Porto Alegre.
- Tanudji, M., Sjöling, S., Glaser, E., & Whelan, J. (1999). Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 274(3), 1286–93.
- Tilney-Bassett, R., & Almouslem, A. (1989). Variation in plastid inheritance between pelargonium cultivars and their hybrids, 63(2), 145–153.
- Timko, M. P., Rushton, P. J., Laudeman, T. W., Bokowiec, M. T., Chipumuro, E., Cheung, F., Town, C. D., et al. (2008). Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. *BMC genomics*, 9, 103.
- Torres-Franklin, M. L., Contour-Ansel, D., Zuily-Fodil, Y., & Pham-Thi, A.-T. (2008). Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from moderate drought stress. *Journal of plant physiology*, 165(5), 514–21.
- Torres-Franklin, M.-L., Gigon, A., de Melo, D.F., Zuily-fodil, Y., Pham-Thi, A.-T., Fernandes de Melo, D. (2007) Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiologia plantarum*. 131(2), 201–210.
- Umbach, A. L., Ng, V. S., & Siedow, J. N. (2006). Regulation of plant alternative oxidase activity: a tale of two cysteines. *Biochimica et biophysica acta*, 1757(2), 135–42.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., & Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *The Plant cell*, 11(9), 1743–54.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2000). Two-component systems in plant signal transduction. *Trends in plant science*, 5(2), 67–74.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), RESEARCH0034.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L. (1997) ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 48, 703–734.
- Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A. T., & Vieira da Silva, J. B. (1990). Electrolyte and Pi Leakages and Soluble Sugar Content as Physiological Tests for Screening Resistance to Water Stress in Phaseolus and Vigna Species. *Journal of Experimental Botany*, 41(7), 827–832.
- Vass, I. (2011) Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiologia plantarum*. 142(1), 6–16.
- Vercesi, A. E., Borecký, J., Maia, I. D. G., Arruda, P., Cuccovia, I. M., & Chaimovich, H. (2006). Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annual review of plant biology*, 57, 383–404.
- Vercesi, A. E., Martins, I. S., Silva, M. A. P., Leite, H. M. F., Cuccovia, I. M., & Chaimovich, H. (1995). PUMPing Plants. *Nature*, 375, 24.
- Vinocur, B., & Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, (16), 123–132.
- Vinocur, B., Altman, A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*. (16), 123–132.
- Wagner, A. M., & Moore, A. L. (1997). Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Bioscience reports*, 17(3), 319–33.



- Wagner, A. M., Krab, K., Wagner, M. J., & Moore, A. L. (2008). Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1777(7-8), 993–1000.
- Weatherley, P. E. (1950). Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. *New Phytologist*, 49(1), 81–97.
- Wetzel, C. M., Jiang, C. Z., Meehan, L. J., Voytas, D. F., & Rodermel, S. R. (1994). Nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 6(2), 161–75.
- Wilkinson, S., & Davies, W. J. (2009). Ozone suppresses soil drying- and abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism. *Plant, cell & environment*, 32(8), 949–59.
- Wilkinson, S., & Davies, W. J. (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, cell & environment*, 33(4), 510–25.
- Wittig, V. E., Ainsworth, E. A., Naidu, S. L., Karnosky, D. F., & Long, S. P. (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(2), 396–424.
- Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Long, Stephen P (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(9), 1150–62.
- Wu, D., Wright, D. A., Wetzel, C., Voytas, D. F., & Rodermel, S. (1999). The IMMUTANS variegation locus of Arabidopsis defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *The Plant Cell*, 11(1), 43–55.
- Xu, Z., Zhou, G., & Shimizu, H. (2010). Plant responses to drought and rewatering. *Plant signaling & behavior*, 5(6), 649–54.
- Yip, J. Y. H., & Vanlerberghe, G. C. (2001). Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. *Physiologia plantarum*, 112(3), 327–333.



