



HAL
open science

Caractérisation d'une oxydase terminale plastidiale impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes et dans la réponse au stress.

Eve-Marie Josse

► **To cite this version:**

Eve-Marie Josse. Caractérisation d'une oxydase terminale plastidiale impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes et dans la réponse au stress.. Biologie végétale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2003. Français. NNT: . tel-00012072

HAL Id: tel-00012072

<https://theses.hal.science/tel-00012072>

Submitted on 31 Mar 2006

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.

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1
SCIENCES & GEOGRAPHIE**

THÈSE

pour obtenir le grade de:

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline: BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Eve-Marie JOSSE

Le 14 Novembre 2003

**CARACTERISATION D'UNE OXYDASE TERMINALE PLASTIDIALE
IMPLIQUEE DANS LA BIOSYNTHESE DES CAROTENOÏDES ET DANS LA
REPONSE AU STRESS**

Sous la direction de Marcel Kuntz et Anne-Marie Labouré

COMPOSITION DU JURY :

Régis Mache	Professeur, Grenoble	Président
Gabriel Cornic	Professeur, Orsay	Rapporteur
Michel Havaux	Ingénieur CEA, Cadarache	Rapporteur
Anne-Marie Labouré	Maître de conférence, Grenoble	Directrice de thèse
Marcel Kuntz	Directeur de recherche CNRS, Grenoble	Directeur de thèse

MERCI

Je tiens à remercier Régis Mache, Silva Mache et Michel Herzog qui m'ont successivement accueillie dans leur laboratoire. Je remercie également Marcel Kuntz, sous la direction duquel a été effectuée cette thèse, ainsi qu'Anne-Marie Labouré, co-directrice de thèse.

Je remercie vivement Michel Havaux et Gabriel Cornic qui ont accepté de juger ce travail. Ce fut non seulement un honneur mais aussi une joie pour moi de vous avoir dans mon jury. Je remercie également chaleureusement Régis Mache d'avoir accepté de se joindre à eux pour présider mon jury de thèse. Merci pour vos conseils, vos critiques et vos nombreux encouragements.

De nombreux collaborateurs ont participé à la réalisation de ce travail. Ces quelques mots sont là pour leur exprimer ma gratitude.

A la station alpine du col du Lautaret, j'ai travaillé avec Serge Aubert, Peter Streb, Richard Bligny et Gabriel Cornic. Ces collaborations ont non seulement été fructueuses mais agréables et sous le signe de la bonne humeur et du sourire. Merci à vous tous.

J'adresse également un grand merci à Thierry Joët, qui a produit les tabacs PTOX+, et avec qui j'ai partagé des discussions scientifiques et personnelles très enrichissantes. Merci pour ton soutien amical, tes relectures salutaires, et tes conseils avisés.

Ce manuscrit a profité de la rigueur scientifique, de la patience, du dévouement, du sens critique et de la richesse d'esprit de Dominique Pontier. Merci d'avoir encadré cette partie de mon travail avec amitié et gentillesse...

Je remercie Norbert Rolland et Solène Kowalski pour leur accueil chaleureux et les échantillons de chloroplaste d'*Arabidopsis*, ainsi que Dominique Rumeau et Gilles Peltier pour l'anticorps anti-Ndh H. Merci à Leïla Zekhroui, qui a repris la purification d'immutans, et qui a toujours été présente pour me prêter du matériel ou me donner un conseil, ainsi qu'à Jean-Pierre Alacaraz, roi de la séquence et de la bonne humeur. Albert-Jean Dorne m'a patiemment "appris" l'oxygraphie et a toujours répondu présent aux (très) nombreux appels à l'aide d'Anne-Marie... un grand merci !

Un énorme merci à toute notre équipe, à l'étendard couleur carotte, qui a été là au quotidien... Marcel Kuntz, notre grand-chef, Anne-Marie Labouré, ma "maman du labo", Joël Gaffé, sans arrêt mort de rire de l'autre côté de la paillasse, Dominique Pontier, soutien inestimable et lectrice assidue de mon manuscrit, Pierre Carol, l'idole de mes années d'étudiante, Eliane Charpentier, fidèle confidente à l'optimisme incroyable, Georg Langenkämper, "kiwi" au large sourire, Nathalie Manac'h, amie et sœur de galère, Andy Simkin, compagnon de pub-du-vendredi-soir mais surtout compagnon d'aventures, Benoît Gilquin et ses "mitochondries rieuses" qui m'ont fendu le cœur en émigrant à l'IAB, et Yec'han Laizet, petit génie de l'informatique et relais absolument indispensable dans les communications Bristol-Grenoble, toujours aussi resplendissant, sauf au coucher du soleil un fameux soir de raid...

Anne-Marie, nos discussions d'entre 19 et 20 heures me manquent et me manqueront... Merci d'avoir été là, de m'avoir écouté, de m'avoir redonné le sourire, de m'avoir souvent remuée, et de m'avoir si souvent servi de médiatrice. Qu'aurais-je fait sans toi ?

Toute cette histoire a commencé il y a 7 ans, pendant mon année de licence, lors du premier cours de mon module de "Biologie Moléculaire Végétale" ; j'y ai découvert un passionné, expliquant le règne végétal avec un enthousiasme que je n'aurai jamais pu soupçonner, et je me souviens avoir noté ses coordonnées dans un inconnu "CERMO", et m'être dit «Voilà, c'est là que je veux travailler...». Merci Régis, sincèrement.

Et le premier TD est arrivé. Et Pierre... LA révélation... depuis cette époque jusqu'à mon arrivée en thèse, Pierre, je n'ai eu qu'un seul but: trouver un moyen de t'épater !

Peter et Serge, je vous dois beaucoup. D'abord une réorientation de mon travail, et un regain d'intérêt pour ce que j'étais en train de faire. Mais surtout, j'ai trouvé en vous 2 amis. Vous n'imaginez peut-être pas à quel point vous m'avez été indispensables...

A tous nos biologistes du CERMO, anciens et actuels, qui m'ont aidée, qui m'ont souri, qui m'ont parlé, qui m'ont écoutée... la liste est bien trop longue pour que je sois exhaustive en un nombre de pages raisonnable pour des remerciements de thèse !... A tous un grand merci d'avoir vécu avec moi ces années.

Un millionième énorme merci à Christophe Deprez, fournisseur officiel d'articles de biochimie et expert en excel, ainsi qu'à Isabelle Prieur-Lavoué, biochimiste émérite, amie fidèle et oreille attentive inégalée !

Durant ces 3 années de thèse, je n'ai pas seulement été une étudiante. Je suis aussi passée de l'autre côté de la barrière grâce au monitorat... outre les joies du CIES et de ses stages avec l'expérience inoubliable offerte par Hervé Raynaud, j'ai également rencontré des "collègues" enseignants qui m'ont beaucoup appris. Parmi eux Jean-Gabriel Valay, Isabelle Prieur-Lavoué, Christiane Keriél, Serge Aimé, Claude Roby, Joël Gaffé, Virginie Stoppin-Mellet, Pierre Carol, Françoise Cornillon, Ghislaine Verrhiest, Benoît Van-der-Reist, Ségolène Mahot, Sandrine Fraboulet, Mohamed Benharouga et Corinne Mercier. Merci... j'ai partagé avec vous et avec nos étudiants les plus jolis moments de ces années.

A Andy, Bebe, Christèle, Christophe, Ciaran, Cyril, Delphine, Didounet, Frédo, Frédouille, Geez, Ghislaine, Hervé-grand-gourou, Jean-Claude, Jérôme, Katel, Kiara, Mahmoud, Maighréad, Magali, Mon cœur, Nam-Binh, Nath, Olivier, Pierre-Alain, P'tit gars, Raphaël, Rémi, Roland, Romain, Rose-Claire, Ségo, Sophie, Sophie, Yec'han et Zaz : un grand merci de m'avoir fait rire, d'avoir répondu à mes mails (comment ça nombreux ???), d'avoir partagé des moments forts, d'avoir été d'accord avec moi, de ne pas avoir été d'accord avec moi, de m'avoir offert des bières, de m'avoir stroké, d'avoir fait la fête, d'avoir tchatché, d'avoir mangé des glaces (et des crêpes !), d'avoir insisté pour avoir de mes nouvelles, de m'avoir fait découvrir vos passions, d'avoir partagé les miennes, d'avoir mis de la couleur, d'avoir conduit ma voiture, de m'avoir appris la montagne, d'avoir supporté mes besoins de montagne, d'avoir accompagné mes délires, de m'avoir ramassé à la petite cuillère, de m'avoir donné de l'énergie, de m'en avoir pris, d'avoir accueilli mon sac de couchage, d'avoir emmené le vôtre, de m'avoir fait participer à vos vies, d'avoir partagé mon quotidien... et surtout, surtout, de m'avoir donné votre confiance. Vous savez bien que vous avez la mienne.

La rédaction de cette thèse s'est laborieusement achevée outre-Manche, et je ne remercierai jamais assez Karen Halliday pour sa confiance, sa discrétion, et ses encouragements dans mon nouveau sujet de recherche. Merci également à ceux qui ont su atténuer ce cruel "culture-shock" qui a tant pesé sur mon quotidien: Catherine & Christopher Richards, Ling-Yi, Sarah, Jennie, Fred, et tout le lab DE8. Thanks a lot !

Merci à ma famille pour tout ce qu'ils sont et font. Papa, fournisseur informatique, receleur de paquets de thé, et "téléphonomaniaque" du dimanche soir heureusement incurable, Maman, "cliente privilège" du café No Name, loueur de voiture et de tupperware, et surtout "oreille-en-chef", Emmanuel & Line, toujours disponibles, même d'outre-Manche, Christian, Mireille & Emilie, refuge provençal indispensable à mon équilibre, Priscilla, Armande et Mamy Janette, systématiquement présentes de l'autre côté de l'e-mail... je vous dois à tous beaucoup.

Merci également au "comité-d'organisation-de-pot-de-thèse" brillantissime, auquel Maman, Emmanuel, Line, Armande, Papy Hubert, Germaine, Rose-Claire, Yec'han, Anne-Marie, Jean-Jacques, Jacinthe, Ciaran, Serge et Maigréad ont participé avec efficacité et brio, ainsi qu'au "comité-de-soutien-à-distance-par-ondes-interposées", qui a du créer de sacrées perturbations ce Vendredi 14 Novembre là, surtout en provenance de Bordeaux, de Lille, de Paris, de Bristol, de Trondheim, de Floride, de Montréal et de Winnipeg. Enfin un énorme merci aux "spectateurs" qui ont fait le déplacement pour venir m'écouter, avec une mention très spéciale à Tristan Lavoué, qui du haut de ses 4 mois et malgré sa grosse fièvre n'a pas perdu un mot de ma présentation ou presque !

Mes derniers remerciements, et non les moindres, iront à ma GiGi : 17 ans d'amitié, de concurrence et de confidences, et nous voici sur le même chemin. Ta réponse au moindre appel au secours a été le meilleur soutien de ces années.

À Véronique Volmat... amie, modèle, et ange-gardien.





SOMMAIRE

SOMMAIRE	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS	11
INTRODUCTION – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	14
1) LE PLASTE ET LA PHOTOSYNTHESE	14
1.1) La structure du chloroplaste (fig 1)	14
1.2) La photosynthèse : réactions et conséquences	15
1.2.1) <i>Le schéma en Z de la photosynthèse</i> (fig 2)	15
1.2.2) <i>Les transferts alternatifs d'électrons</i>	17
1.2.3) <i>Le cycle de réduction du carbone inorganique</i> (fig 6)	19
1.2.4) <i>Les dommages collatéraux de la photosynthèse</i>	20
1.3) Stratégies pour combattre le stress photooxydant	21
1.3.1) <i>Adapter l'absorption de lumière</i>	22
1.3.2) <i>Utiliser l'énergie en excès</i>	23
1.3.3) <i>Détoxiquer les ROS</i>	26
2) LES CHROMOPLASTES ET LES CAROTENOÏDES	28
2.1) Les chromoplastes	28
2.2) Les caroténoïdes	29
2.2.1) <i>Rôles des caroténoïdes</i>	29
2.2.2) <i>Biosynthèse des caroténoïdes</i> (fig 13)	29
2.2.3) <i>Régulations de la voie de biosynthèse des caroténoïdes</i>	31
3) LE MUTANT IMMUTANS	32
4) L'OXYDASE ALTERNATIVE MITOCHONDRIALE : ORIGINE, REGULATIONS ET FONCTIONS.	35
4.1) La voie résistante au cyanure	35
4.2) Activité enzymatique de l'AOX	37
4.4) Régulation de l'activité de l'AOX	40
4.5) Rôles de l'AOX	43
5) OBJECTIF DE CE TRAVAIL	46
MATERIELS ET METHODES	48
I) EXPERIENCES EN SYSTEME BACTERIEN	48
1) SOUCHES ET PLASMIDES UTILISES	48
1.1) Souches bactériennes	48
1.2) Plasmides	48

2) PRODUCTION DE PTOX DANS UN SYSTEME BACTERIEN.....	49
2.1) Construction	49
2.2) Essai de complémentation de la souche <i>E. coli</i> SASX41B.....	49
2.3) Conditions de culture pour la surproduction de PTOX chez <i>E.coli</i> XL1-Blue	49
3) PURIFICATION DE PTOX.....	50
3.1) Localisation de PTOX dans les fractions bactériennes (adapté de Sauge-Merle, 1998)	50
3.2) Purification en conditions dénaturantes.....	50
3.2) Purification en conditions non dénaturantes	51
4) PREPARATION DE MEMBRANES BACTERIENNES (ADAPTE DE LABOURE, 1986).....	51
5) IMMUNODETECTION DE PTOX	52
5.1) Préparation d'extraits bactériens.....	52
5.2) Sonde	52
5.3) Western-blot	52
6) MESURES D'OXYGRAPHIE.....	53
II) EXPERIENCES SUR MATERIEL VEGETAL	54
1) PLANTES UTILISEES	54
1.1) Plantes modèles (fig 25).....	54
1.2) Plantes d'altitude et de plaine (fig 26)	55
2) ANALYSES D'EXPRESSIONS	56
2.1) Au niveau transcriptionnel	56
2.1.1) <u>Extraction d'ARN</u>	56
2.1.2) <u>RT-PCR</u>	57
2.1.3) <u>Séquençage des produits PCR</u>	58
2.2) Au niveau traductionnel.....	58
2.2.1) <u>Purification de chloroplastes</u>	58
2.2.2) <u>Purification de chromoplastes de poivron</u>	59
2.2.3) <u>Préparation de protéines totales</u> (adapté de Hurkman & Tanaka, 1986)	60
2.2.3) <u>Préparation de protéines insolubles</u> (adapté de Joët, 2001).....	61
2.2.4) <u>Western-blot</u>	61
3) TRAITEMENTS STRESSANTS DES BENOITES.....	61
4) MESURE DE LA PHOTOINHIBITION	62
5) ANALYSE DES PIGMENTS	62
5.1) Extraction des pigments de feuilles de tabac	62

5.2) Extraction des pigments de feuilles de Benoîte	63
5.3) Extraction des pigments de fruits de tomate	63
5.4) Analyse par HPLC	63
III) PRODUCTION DE PLANTS DE TOMATES TRANSGENIQUES SUREXPRESSANT PTOX	64
1) CONSTRUCTION.....	64
2) PREPARATION DES AGROBACTERIES.....	64
2.1) Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
2.2) Extraction de l'ADN d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
2.3) Vérification de la construction chez <i>E. coli</i>	65
3) TRANSFORMATION DES TOMATES.....	65
4) REGENERATION ET CULTURE DES PLANTES TRANSFORMEES	66
5) VERIFICATION DES PLANTES TRANSGENIQUES.....	67
IV) ANALYSES DE SEQUENCES	69
1) LOGICIEL D'ANALYSE.....	69
2) LISTE DES ORGANISMES ET DE LEURS ABREVIATIONS	69
CHAPITRE 1 :.....	72
EXPRESSION DE PTOX EN SYSTÈME BACTÉRIEN - IMMUNODÉTECTION DE PTOX DANS LES SOUS-COMPARTIMENTS PLASTIDIAUX.....	72
1) PRODUCTION DE PTOX DANS UN SYSTEME BACTERIEN.....	72
1.1) Surproduction de PTOX.....	72
1.2) Localisation de PTOX	73
1.3) Purification de PTOX.....	74
2) CARACTERISATION DU SERUM ANTI-PTOX.....	74
3) CARACTERISTIQUES DE LA PROTEINE RECOMBINANTE	75
4) EXPRESSION DE PTOX CHEZ LES PLANTES	77
4.1) Détection de PTOX chez les plantes.....	77
4.2) PTOX est localisée dans les thylacoïdes	78
4.3) PTOX est localisées dans des plastes non photosynthétiques	80

CHAPITRE 2 :	83
ACTIVITÉ DE PTOX LORS DE L'EXPRESSION DANS UN SYSTÈME BACTERIEN ..	83
1) COMPLEMENTATION DE L'ACTIVITE RESPIRATOIRE CHEZ LES BACTERIES <i>E. COLI</i> SASX41B	85
2) PRINCIPE DU TEST D'ACTIVITE	86
3) MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE PTOX	87
4) MISE EN EVIDENCE DU SUBSTRAT DE PTOX	89
5) TEST DES INHIBITEURS DE L'AOX	95
6) IMPORTANCE DU PH DANS L'ACTIVITE PTOX	99
7) TEMPERATURE OPTIMALE DE L'ACTIVITE PTOX	101
8) METAUX COFACTEURS DE PTOX	104
9) EFFET DU PYRUVATE SUR L'ACTIVITE PTOX	107
10) RECHERCHE DE REGULATEURS REDOX DE L'ACTIVITE PTOX	109
CHAPITRE 3 :	114
ROLE DE PTOX <i>IN VIVO</i> DANS LA BIOSYNTHESE DES CAROTÉNOÏDES ET LA CHLORORESPIRATION	114
1) PTOX DANS LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES CAROTENOÏDES	114
1.1) Le mutant de tomate <i>ghost</i>	114
1.2) Surexpression de PTOX chez la tomate.....	116
1) ROLE DE PTOX DANS LA CHLORORESPIRATION	118
1.1) Implication de PTOX dans la chlororespiration chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	118
1.2) Implication de PTOX dans la chlororespiration chez <i>Nicotiana tabacum</i>	119
CHAPITRE 4 :	124
PTOX ET STRESS, ROLE DANS L'ADAPTATION DES PLANTES A L'ALTITUDE...	124
1) EXPRESSION DE PTOX CHEZ LES PLANTES ALPINES	125
1.1) Détection de PTOX chez une benoîte	125
1.2) Détection de PTOX par western blot chez les plantes alpines	126
1.3) Détection de PTOX par RT-PCR chez les plantes alpines	129

2) STRATEGIES DE RESISTANCE A LA PHOTOINHIBITION CHEZ LES <i>GEUM</i>.....	131
2.1) Données préliminaires	131
2.2) Mesure du rapport Fv/Fm au cours de traitements stressants chez les 3 espèces de <i>Geum</i>	131
2.5) Expression de PTOX chez les 3 espèces de <i>Geum</i>	133
3) ROLE DE PTOX DANS LA RESISTANCE A LA PHOTOINHIBITION DE <i>RANUNCULUS GLACIALIS</i>	134
3.1) Données sur la renoncule des glaciers	135
3.2) Expression de PTOX chez les Renonculacées	135
3.3) Participation de PTOX à la dé-acclimatation chez <i>Ranunculus glacialis</i>	137
CONCLUSION.....	140
CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES.....	142
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145
PUBLICATIONS ASSOCIÉES AU TRAVAIL DE THÈSE.....	164

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribo nucléique.

ADNc: ADN complémentaire.

AOX: Alternative oxidase ou Oxydase alterne mitochondriale.

APX: Ascorbate peroxydase.

ARN: Acide ribonucléique.

ARNm: ARN messenger.

ATP: Adénosine tri phosphate.

BET: Bromure d'ethidium.

β me: β -mercapto-éthanol.

BSA: Serum albumine bovine.

Cyt: Cytochrome.

Da: Dalton.

DMF: Diméthyl formamide.

DO: Densité optique.

DTT: Dithiothreitol.

EDTA: Ethylene-diamintetra-acetic acid.

Fd: Ferredoxine.

FNR: Fd-NAD⁺ oxydoréductase.

FQR: Fd-Plastoquinone oxydoréductase.

GGPPS: Géranyl géranyl diphosphate synthase.

GR: Glutathion réductase.

H⁺: Proton.

HPLC: High pressure liquid chromatography.

im: immutans.

IPP: Isopentényl pyrophosphate.

IPTG: Isopropylthio- β -galactoside.

KCN: Cyanure de potassium.

LHC: Light harvesting complex ou Complexes collecteurs de lumiere.

NADH: Nicotinamide-adénine dinucléotide.

NADH-dH: NADH déshydrogénase.

NADPH: Nicotinamide-Adénosine di nucléotide phosphate.

NDH: NAD(P)H-plastoquinone oxydoréductase.

OP: Ortho phénantroline.

PC: Plastocyanine.

PCR: Polymerase chain reaction ou Réaction de polymérisation en chaine.

- PDS:** Phytoène désaturase.
- Phéo:** Phéophytine du PSII.
- PMSF:** Phenylmethylsulfonyl fluoride.
- PQ:** Plastoquinone.
- PSI:** Photosystème I (P700).
- PSII:** Photosystème II (P680).
- PSY:** Phytoène synthase.
- PTOX:** Plastid terminal oxidase ou Immutans.
- Q_A/Q_B:** Sites quinones du PSII.
- qE:** Quenching non photochimique dépendant du pH.
- qI:** quenching de photoinhibition.
- ROS:** Reactive oxygen species ou Espèces activées de l'oxygène.
- rpm:** Rotations par minute.
- RUBISCO:** Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase oxygénase.
- SDS:** Sodium dodécyl sulfate.
- SDS-PAGE:** Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.
- SHAM:** Salicylhydroxamic acid.
- SOD:** Superoxyde dismutase.
- UQ:** Ubiquinone.
- VDE:** Violaxanthine dé-époxydase.
- ZDS:** Zêta-carotene désaturase.
- ZE:** Zéaxanthine époxydase.

INTRODUCTION : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1) Le plaste et la photosynthèse

« La photosynthèse est l'un des processus métaboliques les mieux régulés et les mieux intégrés, parce qu'elle doit permettre une utilisation maximale de la lumière, tout en limitant les dommages causés par l'excès de lumière, ceci afin d'optimiser l'utilisation des ressources carbonées et azotées. » (Paul & Foyer, 2001). Voici donc décrit en quelques mots le challenge des plantes : réussir leur autotrophie de façon optimale.

En effet, les plantes, à l'opposé des animaux, sont capables de vivre d'eau, de sels minéraux, de soleil et de CO₂. Cette faculté leur vient en grande partie d'un organe cellulaire présent chez tous les végétaux : le plaste.

Ce plaste est un organe vivant de façon semi-autonome dans la cellule végétale. Possédant un ancêtre commun avec les cyanobactéries (Schwartz & Dayhoff, 1978) il en a gardé quelques caractéristiques, avec la conservation de son ADN et de ses capacités transcriptionnelle et traductionnelle propres, il s'est également adapté à la symbiose avec la cellule végétale en transférant une partie de son génome vers le noyau (Martin & Herrmann, 1998), et il continue à suivre l'évolution de la vie de la plante, reflétant ainsi sa remarquable plasticité.

Effectivement, le même plaste peut devenir chloroplaste dans les tissus verts, chromoplaste dans les fruits ou les fleurs, leucoplaste dans les fleurs, amyloplaste dans les racines, étioplaste en l'absence de lumière, etc., toutes ces formes d'un même organe étant interchangeables et souvent interconvertibles les unes en les autres (Thomson & Whatley, 1980), la spécialisation d'un plaste dans une fonction et un type donné étant liée aux signaux développementaux et environnementaux reçus par la plante.

Dans ce paragraphe, nous allons exclusivement nous concentrer sur le chloroplaste, et sa fonction essentielle, la photosynthèse, et nous aborderons le cas du chromoplaste au paragraphe suivant (cf. §2).

1.1) La structure du chloroplaste (fig 1)

Formé en présence de lumière à partir d'un proplaste indifférencié dans des tissus à destinée photosynthétique, le chloroplaste a pour principale fonction d'assurer l'autotrophie de la plante grâce à la photosynthèse.

Chaque chloroplaste est entouré d'une enveloppe formée d'une double membrane, contrôlant le trafic moléculaire entre l'intérieur et l'extérieur de l'organe. A l'intérieur se trouve un milieu gélatineux appelé stroma, contenant de nombreuses enzymes impliquées dans la transcription et la traduction du matériel génétique plastidial, ainsi que dans les fonctions métaboliques indépendantes de la lumière. Le chloroplaste renferme également une structure membranaire organisée en un empilement de disques aplatis parfois reliés entre eux par des lamelles, l'ensemble formant les thylacoïdes du grana et les thylacoïdes du stroma. Les membranes thylacoïdiennes délimitent un espace

intérieur nommé lumen, et abritent en leur sein l'ensemble de la machinerie photosynthétique lumière-dépendante, des antennes collectrices associées aux pigments photosensibles, aux complexes enzymatiques constituant la chaîne de transport d'électrons. (Salisbury & Ross, 1992)

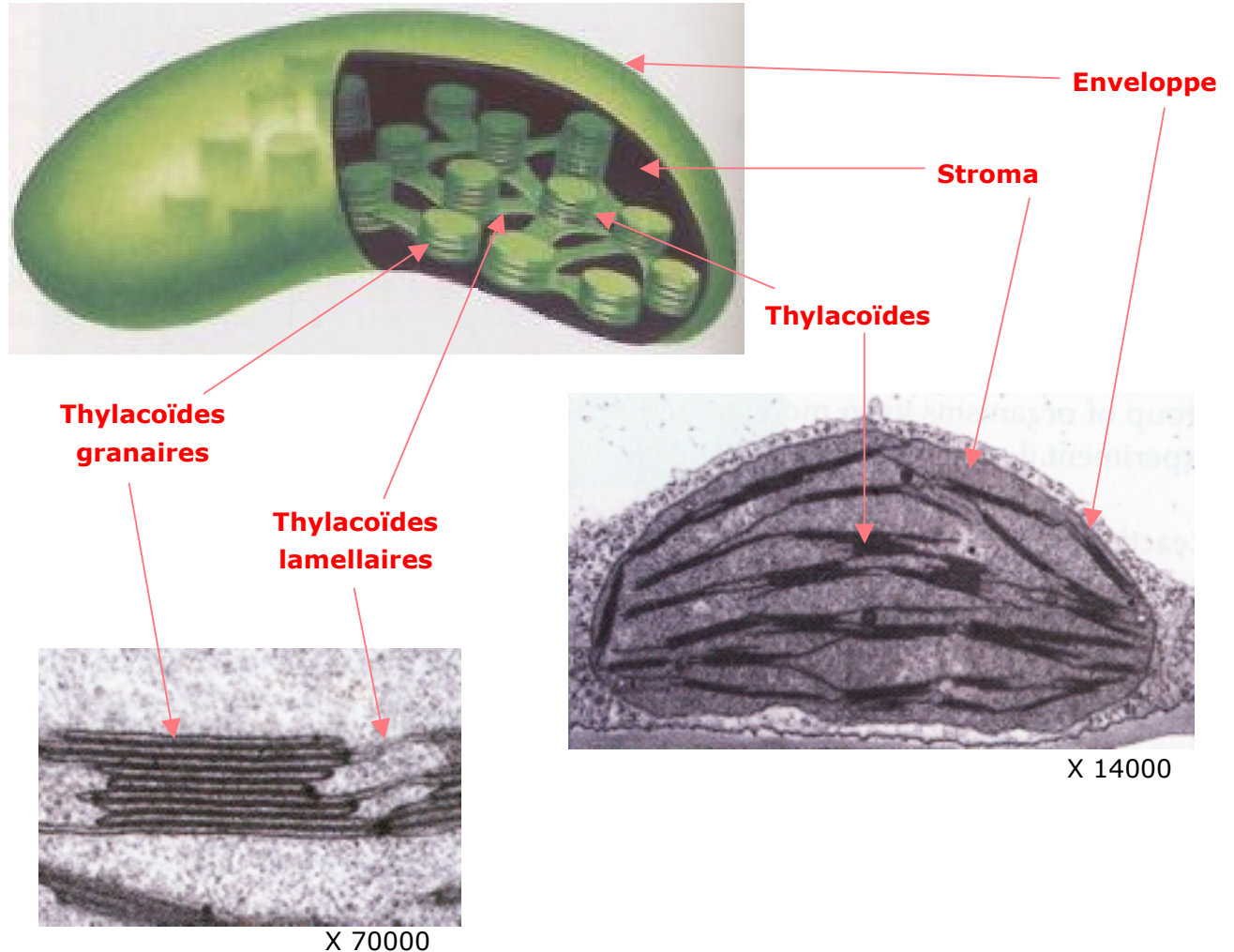


Fig 1: La structure du chloroplaste. Les antennes collectrices associées aux photosystèmes et les complexes enzymatiques de la phase lumineuse de la photosynthèse se retrouvent dans les membranes thylacoïdiennes, tandis que le stroma abrite les enzymes de la phase obscure de la photosynthèse. Electronographies d'après Taiz & Zeiger, 1998.

1.2) La photosynthèse : réactions et conséquences

1.2.1) Le schéma en Z de la photosynthèse (fig 2)

La phase "lumineuse" de la photosynthèse permet de fournir un maximum d'énergie et de pouvoir réducteur afin de permettre le bon déroulement de la phase "obscur", c'est à dire l'assimilation du carbone inorganique. Pour cette étape, 3 participants sont nécessaires : la membrane thylacoïdienne, l'eau, et la lumière.

L'énergie lumineuse est absorbée par les chlorophylles et les caroténoïdes au niveau des antennes collectrices ou LHC (pour Light Harvesting Complex), et est transférée sous forme d'énergie d'excitation vers les centres réactionnels des photosystèmes (P680 pour le photosystème II ou PSII, P700 pour le photosystème I, ou PSI). Au niveau du PSII, P680 réalise une délocalisation de charge et transfère un électron à destination de la phéophytine (Phéo), électron ensuite transféré vers les sites Q_A puis Q_B . P680, alors sous forme oxydée, est capable de recevoir un électron provenant d'un donneur secondaire, Z, lui même à son tour réduit par un électron provenant de l'oxydation de l'eau ("photolyse de l'eau").

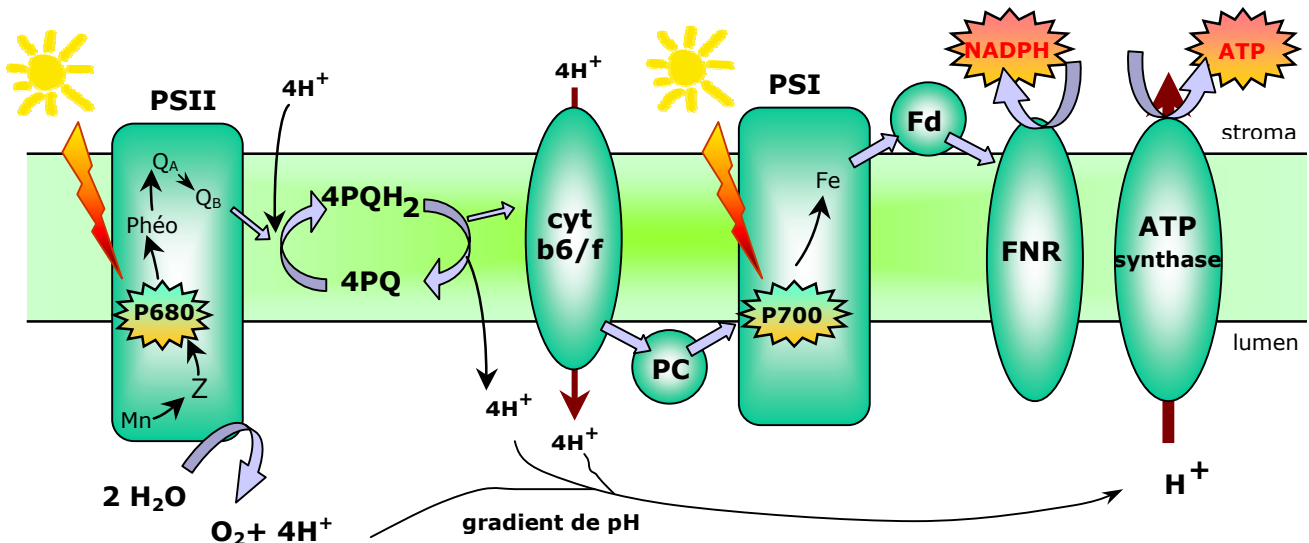


Fig 2: La chaîne de transfert d'électrons photosynthétique, localisée dans les membranes thylacoïdiennes, et lieu de la phase dite lumineuse de la photosynthèse. Ici est représenté le "flux linéaire d'électrons".

Ainsi le bilan de ces réactions montre qu'à partir de 2 molécules d'eau, $4H^+$ sont libérés dans le lumen du thylacoïdes, et 4 électrons transitent dans le PSII jusqu'à Q_B . Lorsque ce dernier a reçu 2 électrons, il lie $2H^+$ provenant du stroma et transfère ses électrons vers le pool des plastoquinones (PQ), servant ainsi de transporteur de H^+ à travers la membrane thylacoïdienne (Joët, 2001 ; Krause & Weis , 1991). Ce pool est alors réoxydé par le cytochrome b6/f (cyt b6/f), au sein duquel le cycle Q permet la translocation de $2H^+$ vers le lumen (Cramer *et al.*, 1996). Les électrons sont ensuite successivement pris en charge par la plastocyanine (PC), puis par le photosystème I (PSI), activé par une nouvelle absorption d'énergie lumineuse comme au niveau du PSII, et enfin par la ferredoxine (Fd), qui va permettre la réaction ultime, génératrice de pouvoir réducteur, grâce à la ferredoxine-NADP⁺-oxydoréductase (FNR). De façon simultanée à la production de NADPH, le gradient de protons est utilisé par l'ATP synthase afin de produire de l'ATP.

Ce flux d'électrons, événement clef de la photosynthèse, est communément nommé "transfert linéaire d'électrons" ou "schéma en Z", par opposition à d'autres transferts d'électrons, dits "alternatifs".

1.2.2) *Les transferts alternatifs d'électrons*

.. *Le transfert cyclique autour du PSI* (fig 3)

Une synthèse d'ATP est possible en l'absence de PSII, ceci grâce à la mise en place d'un transfert d'électrons au cours du PSI, au cours duquel les électrons situés au niveau des molécules à fort pouvoir réducteur (Fd, NADPH) sont redirigés vers le pool de plastoquinone ou le cytochrome b6/f (Bendall & Manasse, 1995 ; Joët, 2001). Ce mécanisme s'accompagne d'une translocation de H⁺ vers le lumen du thylacoïde, permettant l'établissement d'un gradient de pH transmembranaire, générateur d'ATP.

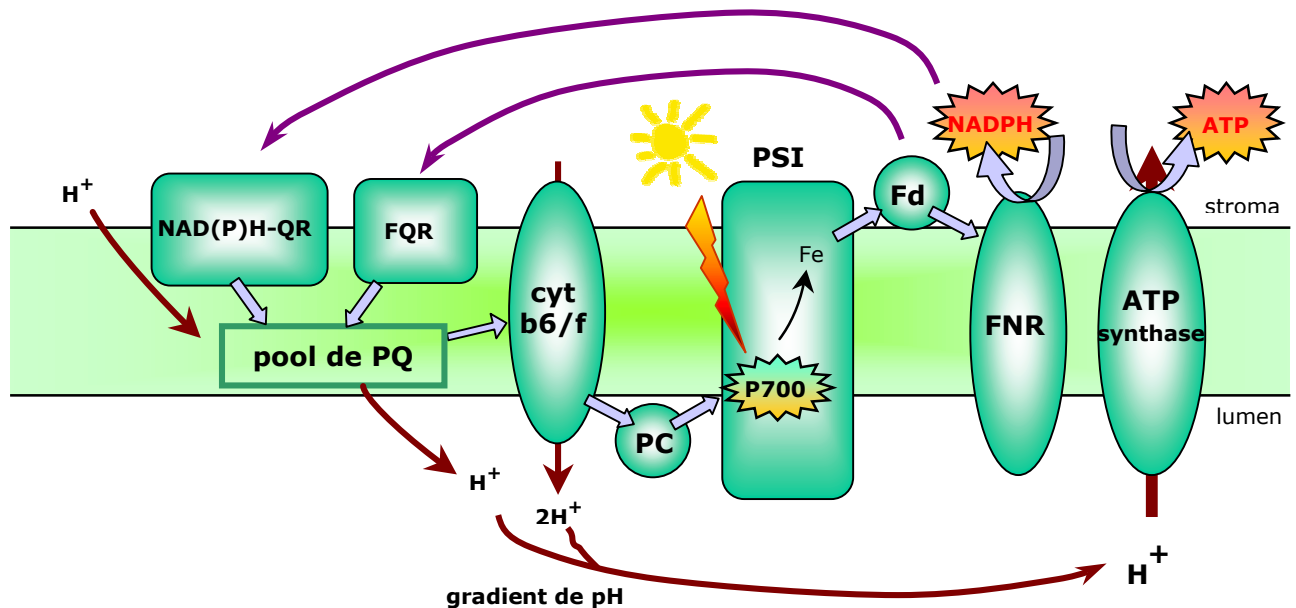


Fig 3: Représentation schématique du flux cyclique d'électrons autour du PSI. Les transferts d'électrons sont visualisés en violet et les transferts de protons en marron.

Les complexes impliqués dans ce transfert d'électrons n'ont pas tous été mis en évidence, et plusieurs voies de transfert cyclique autour du PSI pourraient coexister. Ainsi, 2 voies ont été observées, l'une sensible à l'antimycine A, supposée dépendante de la Fd et médiée par une Fd-PQ oxydoréductase (FQR), et l'autre impliquant une utilisation du NADPH, dont les électrons seraient réintroduits au niveau du pool de PQ par une activité NAD(P)H-PQ oxydoréductase (NAD(P)H-QR) (Ravenel *et al.*, 1994 *in* Peltier & Cournac, 2002).

Il a été trouvé 11 gènes plastidiaux codant pour 11 sous-unités d'une NAD(P)H-plastoquinone oxydoréductase (le complexe NDH), homologue à la NADH déshydrogénase d'*E. coli* (fig 4, Burrows *et al.*, 1998 ; Friedrich *et al.*, 1995 ; Guedeney *et al.*, 1996 ; Leif *et al.*, 1995). Une activité enzymatique correspondante a été caractérisée dans les thylacoïdes de pois (Sazanov *et al.*, 1998). Des mutants de tabac dépourvus du complexe NDH apparaissent normaux en conditions de croissance favorables, mais présentent un transport cyclique d'électrons défectueux (Joët *et al.*, 2001 ; 2002 ; Shikanai *et al.*, 1998), montrant ainsi une implication de ce complexe enzymatique dans le mécanisme de transfert cyclique des électrons autour du PSI.

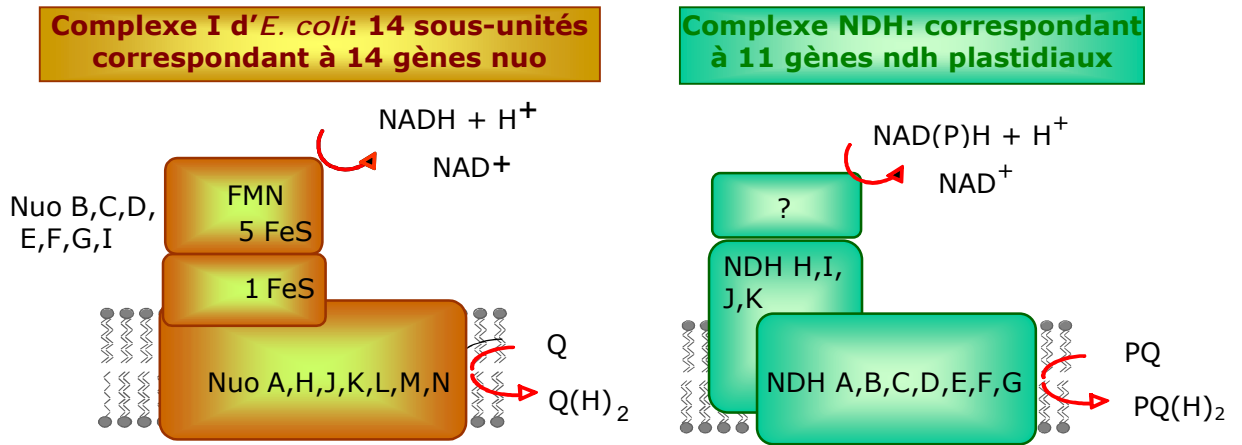


Fig 4: Le complexe I d'*E. coli* et le complexe NDH plastidial, 2 complexes homologues. Le complexe NDH participe à la chaîne respiratoire chloroplastique. Schéma d'après Joët, 2001.

Cette voie de transport d'électrons alternative permet la formation d'ATP sans production de pouvoir réducteur (i.e. de NADPH), participant ainsi à l'équilibrage du ratio ATP/NADPH dans le chloroplaste : ce mécanisme permet ainsi de fournir une quantité supplémentaire d'ATP permettant un cycle de Calvin optimal (cf. §1.2.3).

.. La chlororespiration

La chlororespiration a été définie comme une chaîne de transport d'électrons respiratoire existant en interaction avec la chaîne de transport d'électrons des membranes thylacoïdiennes, au sein du chloroplaste. Cette chaîne respiratoire permettrait donc un transfert d'électrons depuis le NAD(P)H vers l'O₂ via le pool de PQ (Bennoun, 1982). Ce mécanisme, non encore élucidé d'un point de vue moléculaire, devrait nécessairement impliquer 2 activités enzymatiques (fig 5) : d'une part une NAD(P)H déshydrogénase capable de réduire le pool de PQ, et d'autre part une oxydase permettant sa réoxydation en utilisant l'O₂ comme accepteur final d'électrons.

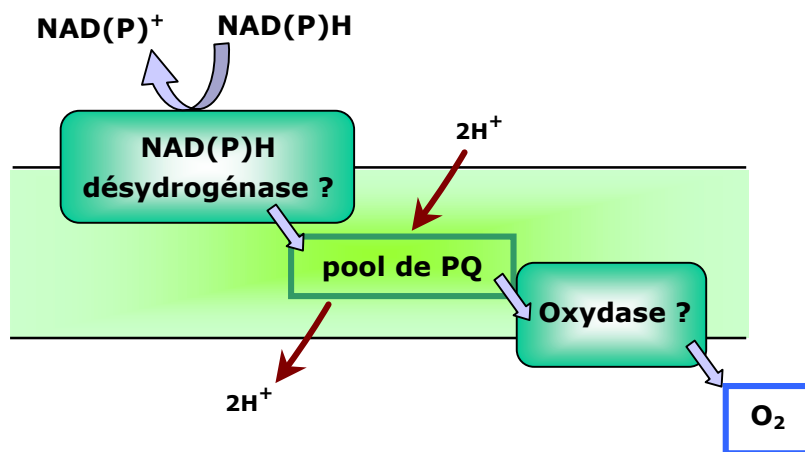


Fig 5: La chlororespiration implique une réduction puis une réoxydation non photochimique du pool des PQ. Schéma d'après Joët, 2001 et Peltier & Cournac, 2002.

Nous avons précédemment décrit le complexe NDH plastidial, susceptible d'accomplir cette réduction non photochimique du pool de PQ (pour revue : Peltier & Cournac, 2002). Quant à l'oxydation non photochimique des PQ, elle suppose la présence d'une oxydase chloroplastique : cette oxydase est justement l'objet de la présente étude.

1.2.3) Le cycle de réduction du carbone inorganique (fig 6)

Ce cycle, correspondant à la phase dite "obscur" de la photosynthèse, utilise l'énergie fournie par la phase lumineuse pour permettre *in fine* la synthèse de molécules carbonées directement utilisables (saccharose) ou permettant le stockage des réserves (amidon).

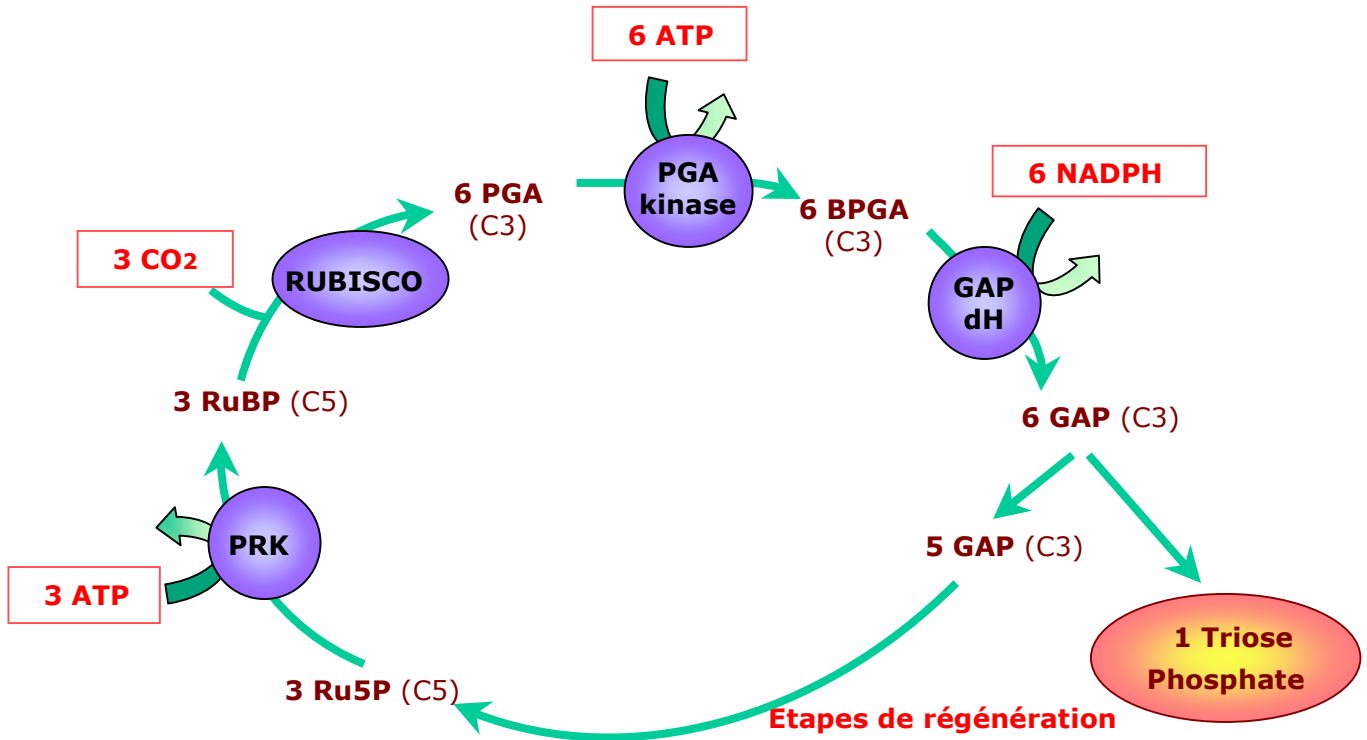


Fig 6: Le cycle de Calvin, correspondant à la phase dite obscure de la photosynthèse. L'assimilation du carbone dans un triose phosphate à partir du CO₂ atmosphérique nécessite l'utilisation de l'énergie fournie par la chaîne de transport d'électrons photosynthétique.

RuBP: Ribulose 1,5 bis phosphate, GAP: Glycéraldéhyde 3 phosphate, PGA: Phosphoglycérate, BPGA: Biphosphoglycérate, PRK: Phosphoribulokinase.

En absence de photorespiration (cf. §1.3.2), le bilan net du cycle de Calvin (fig 6) est la production d'une molécule de triose-phosphate pour 3 CO₂ fixés, 6 NADPH et 9 ATP utilisés, et l'enzyme clef de ce cycle, la RUBISCO (Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase oxygénase) est la protéine la plus répandue sur terre, représentant à elle seule 40% de la masse de protéines solubles des feuilles. Elle fixe environ 10% du CO₂ atmosphérique par an.

Il est cependant parfaitement impossible de dissocier le cycle de Calvin et la photorespiration (fig 7). De façon intéressante, Tolbert décrit la photorespiration comme étant une part entière de la photosynthèse, les 2 cycles, le cycle oxydatif du C₂ (ou photorespiration) et le cycle réducteur du C₃ étant pour lui totalement indissociables (Tolbert, 1997). La photosynthèse n'est plus ici considérée comme la production d'O₂ et la fixation de CO₂, mais comme un seul mécanisme intégré, gérant les pools d'O₂ et de CO₂ de façon concertée selon les besoins de la plante.

Reposant sur la double fonctionnalité de la RUBISCO, carboxylase mais aussi oxygénase, la photorespiration permet l'établissement d'un cycle futile très consommateur d'énergie lorsque la quantité de CO_2 disponible dans le plaste chute : il permet de former au total 5 PGA à partir de 3 RuBP, ceci sans fixation de carbone exogène. Ce cycle implique l'activité d'enzymes peroxysomales et mitochondriales (fig 7), et fait donc participer 3 compartiments subcellulaires.

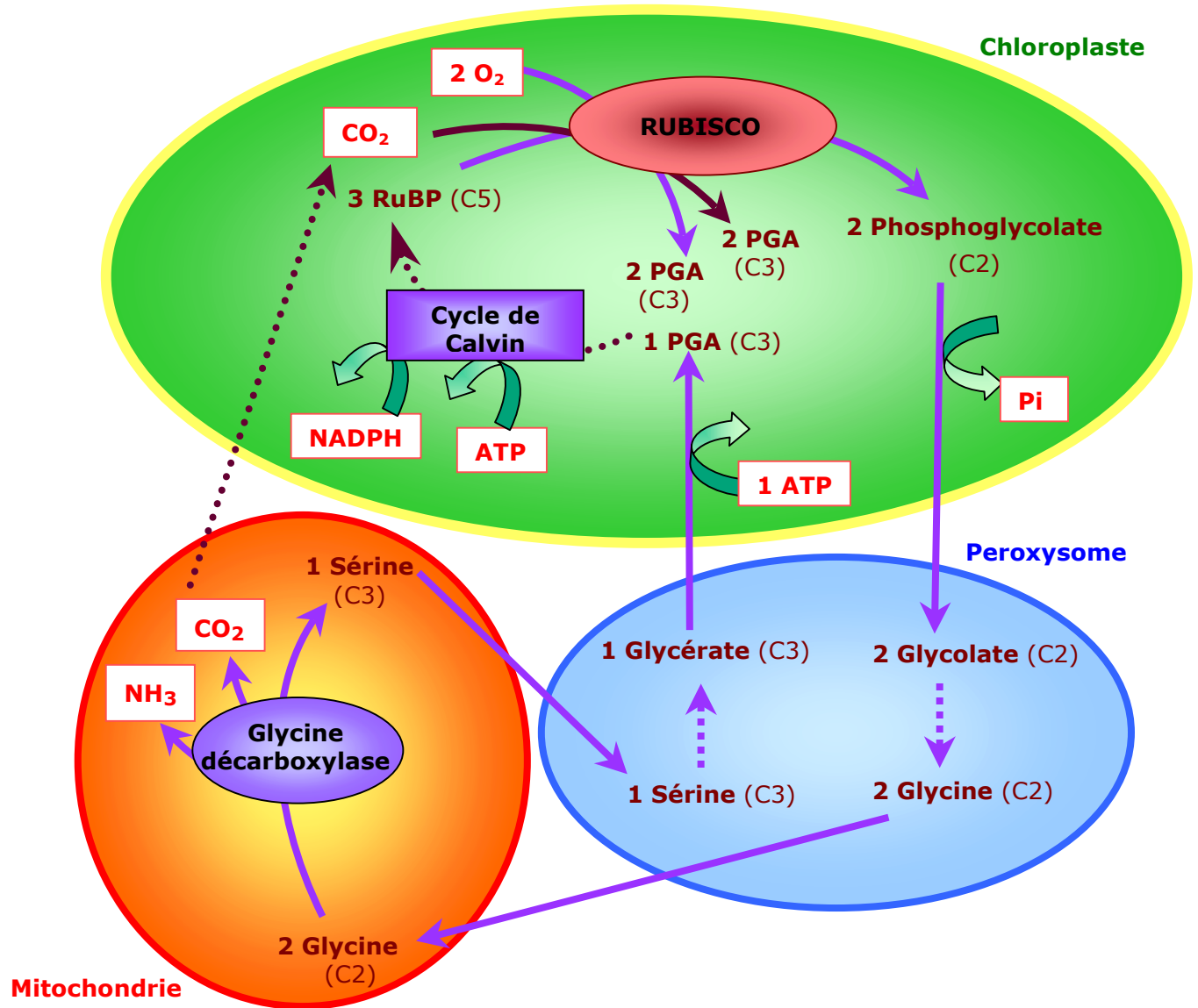


Fig 8: Cycle photorespiratoire des plantes en C3. Au total, ce cycle permet de former 5PGA à partir de 3RuBP sans fixation de carbone exogène, et ce grâce à l'intervention d'enzymes peroxysomales et mitochondriales. Il y a ici utilisation de l'énergie sans fixation de carbone nette.

1.2.4) Les dommages collatéraux de la photosynthèse

La phase lumineuse de la photosynthèse est source d'une formidable quantité d'énergie, mais également d'une très forte production de molécules dangereuses pour l'intégrité des structures plastidiales : les molécules d'oxygène réactives (ou ROS pour Reactive Oxygen

Species, fig 9). (pour revue : Foyer, 1997 ; Foyer *et al.*, 1994 ; Niyogi, 1999). En effet, lorsque l'énergie lumineuse absorbée est excessive par rapport aux capacités du cycle de Calvin, un excès de pouvoir réducteur est formé. Cette énergie en excès est alors déviée vers la réduction de l'oxygène moléculaire au sein de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique, à l'origine de la production d'un nombre varié de molécules : l'ion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle OH^{\cdot} , ... toutes ces molécules étant d'une part de toxicité variable pour le plaste, et d'autre part interconvertibles les unes dans les autres (Foyer, 1997) (fig 9).

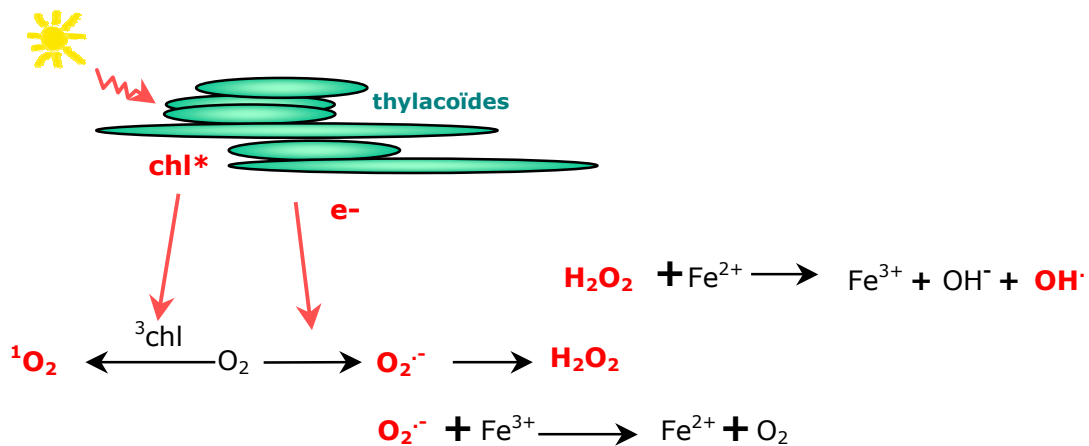


Fig 9: Les ROS produits par le chloroplaste, au cours de la phase lumineuse de la photosynthèse. Ces molécules sont toxiques et interconvertibles les unes dans les autres. Schéma d'après Foyer, 1997 et adapté de Manac'h, 2000.

Cette production de ROS en présence de lumière est nommée "stress photooxydant", et constitue un élément limitant l'efficacité de la photosynthèse, puisque ces espèces réactives sont susceptibles de provoquer des dommages importants à proximité de leurs lieux de formations : oxydations des pigments photoprotecteurs, des protéines, peroxydations en chaîne des lipides membranaires, lésions oxydatives des acides nucléiques, ces différentes destructions pouvant endommager de manière irréversible l'appareil photosynthétique. La production de ROS est inévitable au cours de la photosynthèse, et des systèmes efficaces de détoxication de ces espèces dangereuses existent au sein du plaste (cf. §1.3.3). L'accumulation de ces ROS provient d'un déséquilibre entre la fourniture d'énergie par la chaîne de transfert et les besoins métaboliques du plaste : la chaîne de transfert photosynthétique, transitoirement saturée, provoque alors un passage des électrons directement vers l' O_2 .

1.3) Stratégies pour combattre le stress photooxydant

Plusieurs stratégies de lutte contre le stress photooxydant coexistent au sein du chloroplaste, et sont mises en œuvre de façon simultanée. L'une des causes de la production trop importante d'énergie par la phase lumineuse de la photosynthèse est l'exposition de la plante à des intensités lumineuses très élevées : adapter l'absorption lumineuse à la demande métabolique permet alors de diminuer les risques de dommages encourus par l'appareil photosynthétique. Si certaines protéines sont néanmoins détruites, une réparation efficace doit être mise en place.

Il est également possible d'agir en aval de la collecte de lumière afin empêcher la formation des ROS, soit en trouvant une ou des façons d'utiliser l'énergie produite en excès par la phase lumineuse de la photosynthèse, soit en organisant un "gaspillage" d'énergie grâce à l'utilisation de "valves de sécurité". Enfin, puisque des ROS sont inévitablement produits, des systèmes de détoxification actifs permettent de limiter leur accumulation et les dégâts qu'ils produisent.

1.3.1) Adapter l'absorption de lumière

Lorsque l'apport de lumière à l'appareil photosynthétique est excessive en comparaison des capacités d'assimilation de la plante, celle-ci est capable de procéder à des changements morphologiques permettant de limiter l'absorption lumineuse, avec une adaptation des feuilles qui présentent alors une pilosité abondante, de nombreux trichomes, ou une inclinaison permettant de diminuer une absorption directe trop importante des rayons lumineux (Taiz & Zeiger, 1998). D'autres part, en présence de forte lumière, les chloroplastes sont capables de mouvements permettant d'obtenir une inclinaison parallèle à la lumière incidente, minimisant ainsi l'absorption lumineuse (Taiz & Zeiger, 1998).

De plus, des changements de la taille des antennes collectrices de lumière associées aux photosystèmes permettent de réguler les besoins et les excès de la photosynthèse. Lors d'acclimations à long terme chez des algues vertes, le changement de la taille des antennes peut être dû à un changement dans l'expression des gènes codant pour les protéines CAB (pour Chl a/b binding protein), constituants protéique des LHC (Escoubas *et al.*, 1995 ; Maxwell *et al.*, 1995). Une dégradation protéique permettant une telle régulation a également été décrite chez l'épinard (Lindahl *et al. in* Niyogi, 1999).

A plus court terme, la taille des antennes peut également être modifiée suite au phénomène de transition d'état des antennes. Ce phénomène a été mis en évidence chez l'algue unicellulaire *Chlamidomonas reinhardtii*. Une réduction importante du pool de plastoquinone (en cas de saturation de la chaîne de transfert d'électrons) active une kinase capable de phosphoryler les complexes associés aux antennes du PSII. Ces LHC phosphorylés se détachent du PSII, diminuant de ce fait la taille des antennes collectrices et migrent vers le PSI. (pour revue, Wollman, 2001). Ce mécanisme participe au quenching non photochimique de la fluorescence (QT du NPQ) (Müller *et al.*, 2001), et permet une redistribution de l'énergie lumineuse vers le PSI, permettant un maintien de production de l'ATP grâce au flux cyclique d'électrons autour du PSI, ATP nécessaire aux mécanismes de réparation des éventuels dommages causés aux constituants du PSII (Finazzi *et al.*, 2001).

En effet, la première cible de dommages dus à l'excès de lumière est la protéine D1 du PSII (Long *et al.*, 1994). La protéine D1, associée à la protéine D2, constitue le cœur du centre réactionnel du PSII. Le terme "photoinhibition" désigne communément cette destruction de la protéine D1, conduisant à une baisse du rendement quantique de la photosynthèse. Il existe un mécanisme de réparation de ce PSII particulièrement rapide, soutenu par un turn-over de D1 très organisé, régulé et compartimenté dans les membranes thylacoïdiennes (pour revue : Aro *et al.*, 1993 ; Long *et al.*, 1994): il permet

de ce fait de réguler la quantité de PSII actif et ainsi de diminuer la quantité de lumière efficace absorbée par le plaste, et il constitue également une stratégie de lutte contre le stress en réparant rapidement les dommages causés par la lumière.

1.3.2) Utiliser l'énergie en excès

.. Augmenter l'assimilation de carbone

Différentes stratégies peuvent être développées par les plantes pour utiliser l'énergie produite en excès par la phase lumineuse de la photosynthèse, la plus intéressante pour la plante étant l'augmentation des capacités d'assimilation du carbone.

Les plantes adaptées au froid, donc habituées à une situation de stress susceptible de causer des dommages photooxydatifs, semblent posséder une adaptation de ce type : les variétés hivernales de blé possèdent ainsi une activité spécifique 2 fois plus importante de la fructose-1,6 biphosphatase ainsi qu'une activité de 1,5 à 2 fois supérieure de la saccharose-phosphate synthase comparée aux variétés printanières (Hurry *et al.*, 1995), et l'adaptation d'*Arabidopsis thaliana* à une croissance à faible température provoque une redirection du métabolisme vers la production de saccharose et une augmentation de l'activité des enzymes du cycle de Calvin (Strand *et al.*, 1999). De ce fait, ces plantes accumulent plus de saccharose ou de sucre sous forme soluble: on entrevoit ici une augmentation générale des capacités d'assimilation du CO₂, ce qui permet d'utiliser l'énergie produite en trop.

Ce type d'adaptation est couramment retrouvé chez les plantes de haute montagne, qui doivent subir de fréquents changements climatiques, ainsi que des températures et des intensités lumineuses parfois extrêmes. La soldanelle des Alpes (*Soldanella alpina*) pousse jusqu'à environ 2500m d'altitude et doit de ce fait se développer et optimiser sa photosynthèse dans les conditions stressantes de haute montagne. Elle possède une bonne capacité de photoprotection, malgré un flux photosynthétique abondant, corrélée d'une part à une forte activité des enzymes antioxydatives, et d'autre part à une concentration d'ascorbate jusqu'à 5 fois plus importante dans ses feuilles comparée à d'autres plantes d'altitude (Streb *et al.*, 1998). Plusieurs données et notamment le fait qu'une addition exogène d'ascorbate ne permet pas une photoprotection efficace (Leipner *et al.*, 2000) suggèrent une capacité d'assimilation accrue chez cette plante grâce à l'utilisation massive de sucres solubles pour la synthèse d'ascorbate. Ainsi, il semblerait qu'en utilisant toute l'énergie fournie par la photosynthèse pour fabriquer cet anti-oxydant, la plante limite la formation des ROS, et se donne les moyens d'éviter leur accumulation (cf. §1.3.3).

.. Gaspiller l'énergie grâce à des "valves de sécurité"

Plusieurs mécanismes permettant d'organiser un gaspillage d'énergie peuvent coexister chez certaines plantes, et sont la plupart du temps décrits comme étant des "valves de sécurité" pour la photosynthèse (pour revue : Niyogi, 2000). Cette échappée d'énergie, nécessaire lorsque les conditions environnementales provoquent une photosynthèse

accrue (notamment une luminosité élevée), peuvent résulter en une dissipation de photons ou d'électrons, selon les mécanismes mis en jeu (fig 10).

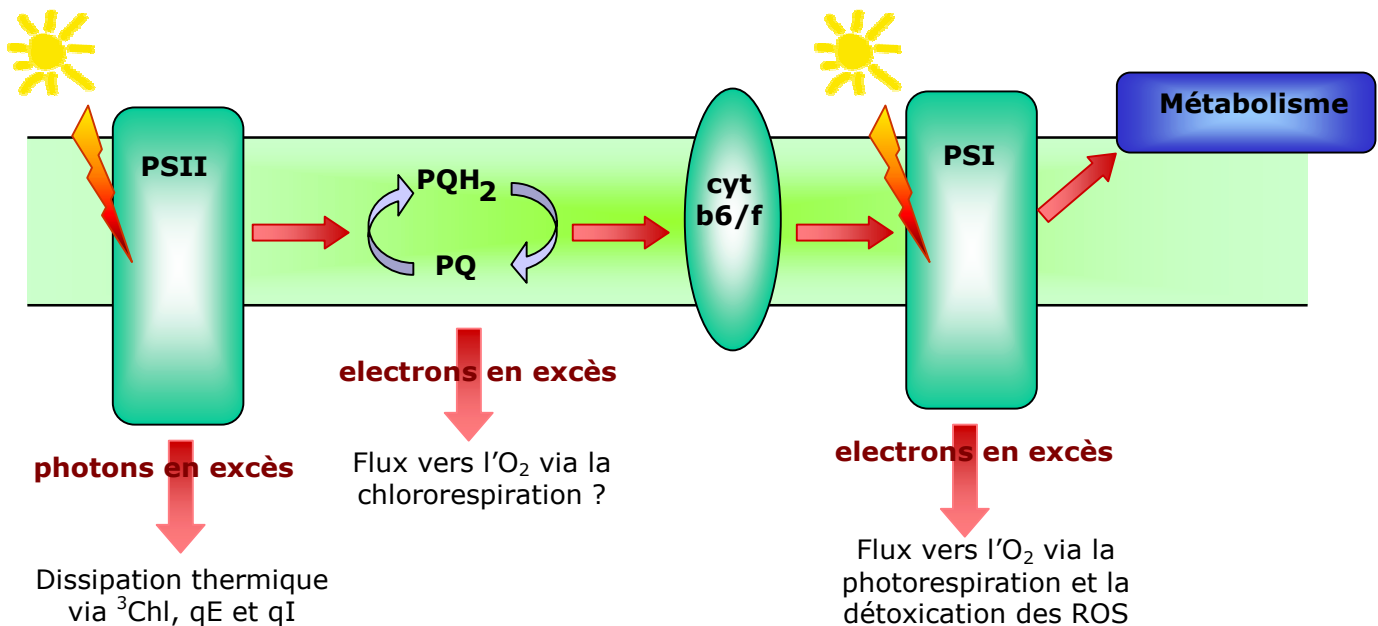


Fig 10: "Valves de sécurité" permettant l'organisation d'un "gaspillage d'énergie" conduisant à la dissipation des photons et des électrons en excès au cours de la phase lumineuse de la photosynthèse. Les différents mécanismes cités ici sont expliqués dans le paragraphe qui suit. Schéma adapté de Niyogi, 2000.

Au niveau du PSII

L'apport d'un excès de photons peut provoquer une accumulation d'énergie au sein du complexe de collecte de lumière du PSII, provoquant une augmentation de la durée de vie de ¹Chl. Cette espèce, responsable du transfert d'énergie initiateur du transport d'électrons photosynthétique, peut alors être spontanément transformée en ³Chl. La ³Chl est, elle, incapable de céder un électron à l'accepteur primaire Q_A, et sa formation correspond ainsi à une dissipation des photons absorbés, puisqu'elle est efficacement dé-excitée par un transfert d'énergie vers les caroténoïdes, qui ont alors un rôle photoprotecteur. (Niyogi, 2000)

En plus de ce processus constitutif, il existe un mécanisme inductible : le quenching non photochimique dépendant du pH (qE). Il se traduit par une dissipation des photons en excès sous forme de chaleur. Il peut être vu comme un contrôle rétroactif de la photosynthèse, puisqu'il est déclenché par une chute du pH luminal, chute due à un transfert important de protons par le flux linéaire de transfert d'électrons (Horton *et al.*, 1996). Cette baisse de pH active une enzyme luminale, la violaxanthine dé-époxydase (VDE), qui convertit la violaxanthine en zéaxanthine au cours du cycle des xanthophylles (fig 11). Il existe une corrélation claire entre le qE, c'est à dire la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, et la présence de zéaxanthine, ceci chez de nombreuses espèces de plantes (Demmig-Adams & Adams, 1996).

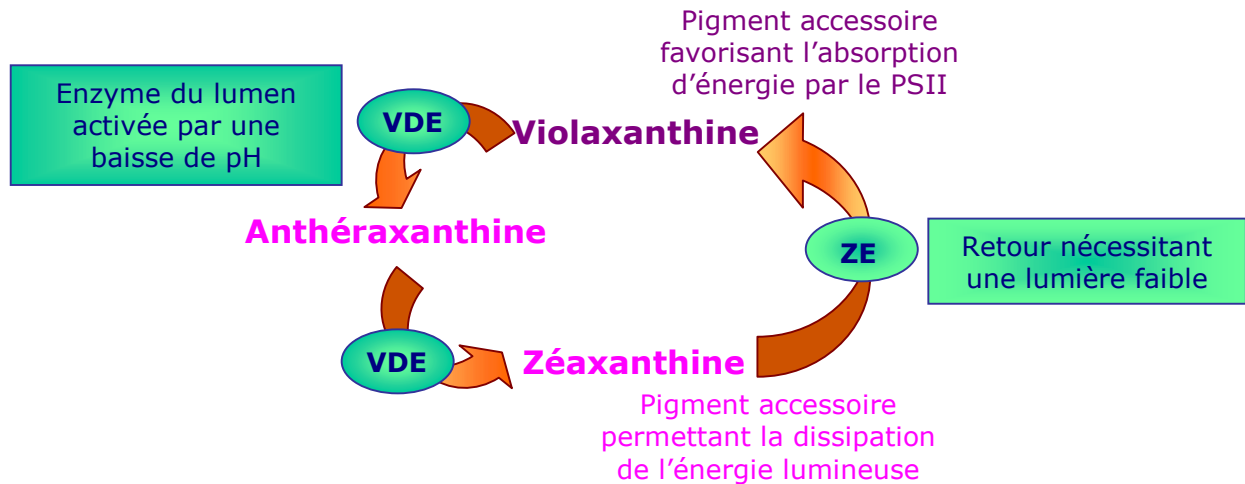


Fig 11: Le cycle des Xanthophylles, participant au quenching non photochimique de l'énergie au niveau du PSII lorsque la photosynthèse est très active.

Ce changement de pH provoque également la protonation d'une ou plusieurs protéines associées au complexe de collecte de lumière du PSII. (Horton *et al.*, 1996). Différentes études utilisant la caractérisation de mutants déficients en VDE ou en PsbS, une sous-unité du PSII, ont montré une implication de ces différents facteurs dans l'établissement du qE (Demmig-Adams & Adams, 2000 ; Havaux *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2000 ; Niyogi *et al.*, 1997). Il semble que la protonation de PsbS et sa liaison à la zéaxanthine provoquent un changement de conformation de cette protéine, changement nécessaire à la désactivation de la ^1Chl (Li *et al.*, 2000). Cependant, le mécanisme biophysique exact permettant la désactivation de la ^1Chl n'est pas connu. Ainsi, la présence de PsbS et de la zéaxanthine sont nécessaires à l'établissement du qE, et le cycle des xanthophylles permet de convertir un pigment accessoire favorisant la collecte de la lumière (la violaxanthine), en un quencher efficace (la zéaxanthine) (Demmig-Adams & Adams, 1992 ; Havaux & Niyogi, 1999). La zéaxanthine non liée à PsbS semble également avoir un rôle photoprotecteur important, puisqu'en agissant en synergie avec l' α -tocophérol, elle protégerait les lipides membranaires de la peroxydation (Havaux & Niyogi, 1999 ; Havaux *et al.*, 2000).

Outre les fluctuations à court terme permettant une réponse rapide face à un excès d'énergie au sein de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique, la majorité des plantes confrontées à un stress saisonnier possède également une régulation se mettant en place à plus long terme. Il semble que cette régulation fasse intervenir les mêmes partenaires que le qE. Cependant, si cette dissipation de l'excès d'énergie sous forme de chaleur provoque une baisse de l'efficacité de la photosynthèse, elle ne dépend cette fois pas systématiquement du pH, et est nommée "quenching de photoinhibition" (qI). Le qI a été étudié notamment chez des espèces à feuillage persistant, chez lesquelles la dissipation d'énergie n'est réversible que lentement, suite au réchauffement des feuilles, et dans lesquelles il a été montré que comme pour le qE, le qI est corrélé à une accumulation de zéaxanthine, et la récupération des pleines capacités photosynthétiques est associée à une reconversion de la zéaxanthine en violaxanthine (fig 11) (Niyogi, 2000). Enfin, des évidences spectroscopiques confirment l'idée que cette acclimatation

est associée à des changements d'organisation ou de composition des complexes contenant de la chlorophylle (Gilmore & Ball, 2000).

Au niveau du pool de plastoquinone

Un excès d'énergie dans la chaîne de transfert d'électrons se traduit par un état très réduit du pool de plastoquinone, empêchant ainsi le transfert des électrons depuis le PSII vers ce pool : l'énergie ne peut s'échapper du PSII, et si ses capacités de quenching sont dépassées, il y a photoinhibition : le PSII est détruit, ou inactivé de façon plus ou moins irréversible. Une réoxydation du pool des quinones permettrait donc de réduire ce phénomène de photoinhibition.

Nous avons vu qu'une réoxydation non photochimique du pool des quinones, seconde étape de la chlororespiration, suppose la présence d'une oxydase chloroplastique, qui est l'objet de la présente étude. La présence d'une telle oxydase pourrait avoir une signification importante en apportant une nouvelle fonction de "valve de sécurité" au niveau du pool de plastoquinone, ce qui pourrait ajouter un mécanisme supplémentaire de résistance à la photoinhibition pour la plante confrontée à des situations stressantes.

Au niveau du PSI

Lorsqu'il est impossible d'augmenter la capacité d'utilisation de l'énergie fournie par la chaîne de transfert d'électrons en assimilant plus de carbone par exemple, il est possible de trouver d'autres accepteurs d'électrons au niveau du PSI. Ces accepteurs d'électrons alternatifs doivent servir de molécules-puits capables d'absorber les excès d'énergie. Plusieurs mécanismes coexistent et soutiennent ce type de régulation.

L'O₂ est une molécule-puit utilisée au niveau du PSI, et ce grâce à 2 mécanismes conjugués à la photosynthèse : la photorespiration d'une part (cf. §1.2.3) et le cycle de l'eau d'autre part.

En effet, le blocage de la photorespiration conduit systématiquement à une inhibition de la photosynthèse et à l'apparition de photooxydation (Niyogi, 1999) : ceci montre une implication de ce mécanisme dans la régulation du niveau d'énergie du plaste.

Le cycle de l'eau - ou réaction de Mehler - est lié à la détoxication des ROS, et est décrit dans le paragraphe suivant.

1.3.3) Détoxiquer les ROS

Les moyens de défense développés par la plante pour lutter contre les ROS sont nombreux et différents selon les espèces réactives produites. (cf. fig 9)

Si le quenching de la ³Chl n'intervient pas rapidement, cette espèce, qui n'est pas une espèce dangereuse en soi, peut provoquer la formation de ¹O₂, espèce hautement réactive et dangereuse. La protection contre ¹O₂ s'effectue essentiellement grâce à la présence de caroténoïdes (fig 12) localisés dans les antennes collectrices, et capables de désactiver l'énergie d'excitation de l'O₂ (Foyer, 1997 ; Polle, 1997 ; Niyogi, 2000).

$O_2^{\cdot-}$, essentiellement produit au niveau du PSI, est efficacement détoxiqué par l'action de l' α -tocophérol (ou la vitamine E), antioxydant lipophile le plus mobile dans les membranes thylacoïdiennes (Fryer, 1992 *in* Polle, 97). Il permet de stopper la formation de peroxydes de lipides en chaîne au sein du plaste, et ainsi de conserver des membranes plastidiales intactes (Niki *et al.*, 1984 *in* Polle, 97). L' α -tocophérol, oxydé en radical d' α -chromanoxyl, est régénéré par l'action de l'ascorbate (Packer *et al.*, 1979 *in* Polle, 97).

L'ascorbate (ou la vitamine C) a un rôle central dans les processus de détoxification cellulaire. Les chloroplastes contiennent jusqu'à 40% du pool d'ascorbate cellulaire, avec des concentrations de l'ordre de 20mM (Polle, 97). L'ascorbate désactive 1O_2 , régénère le tocophérol et réduit $O_2^{\cdot-}$ (Asada, 1992). De plus, il sert de substrat dans la détoxification enzymatique de H_2O_2 (fig 12) (Hossain & Asada, 1984 *in* Foyer, 1997) et est nécessaire à la conversion de la violaxanthine en zéaxanthine dans le cycle des xanthophylles.

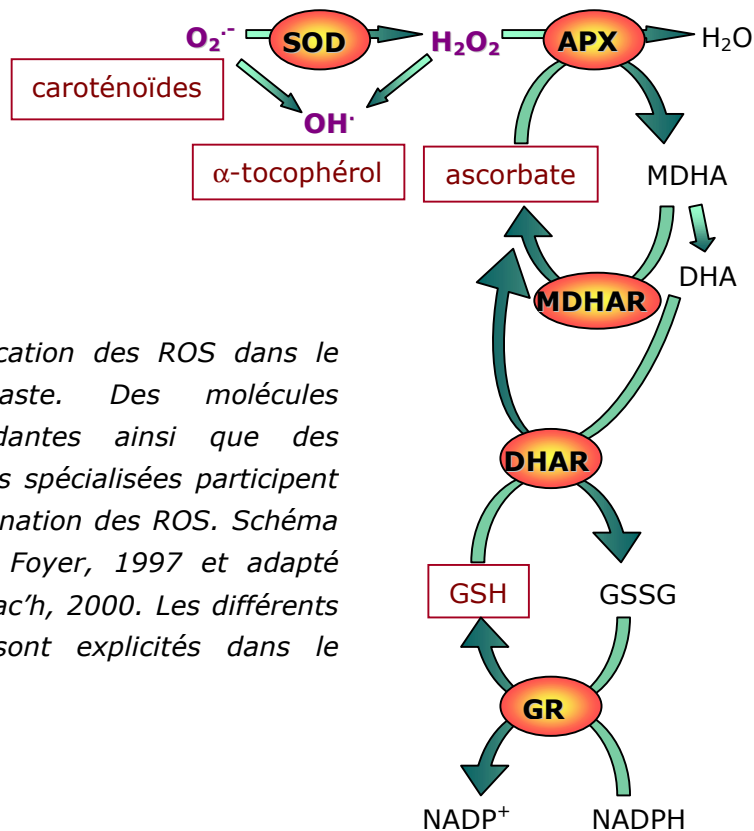


Fig 11:
Détoxification des ROS dans le chloroplaste. Des molécules antioxydantes ainsi que des enzymes spécialisées participent à l'élimination des ROS. Schéma d'après Foyer, 1997 et adapté de Manac'h, 2000. Les différents sigles sont explicités dans le texte.

Dans ces réactions, l'ascorbate est oxydé en radicaux de monodehydroascorbate (MDHAR), et a besoin d'être régénéré, utilisant de ce fait le pouvoir réducteur produit par la phase lumineuse de la photosynthèse, soit en interagissant directement avec la ferredoxine (Miyake & Asada, 1992 ; 1994 *in* Foyer, 1997), soit par l'action de la MDHAR réductase couplée à l'action de la dihydroascorbate réductase (DHAR), réactions consommatrices de $NADPH$ (Hossain *et al.*, 1984 *in* Foyer, 1997) (fig 12)

Enfin, le glutathion (GSH) participe également à ces détoxifications, avec un rôle particulier dans la protection des protéines à groupements thiols, nombreuses dans le plaste, ainsi qu'un rôle de réducteur dans le recyclage de l'ascorbate (Foyer, 1997 ; de Kok & Oosterhuis, 1983 ; Schöner & Krause, 1990, ces 2 références *in* Polle, 1997), le

pool de glutathion réduit (GSSG) étant maintenu à son niveau dans le plaste grâce à l'action de la glutathion réductase (GR) (Polle, 1997) (fig 12).

Il existe également des enzymes détoxiquantes spécialisées dans cette fonction. La plus importante ici est la superoxyde dismutase (SOD), qui catalyse la formation de H_2O_2 à partir d' $O_2^{\cdot-}$ (Mc Cord & Fridovich, 1969 *in* Polle, 1997) (fig 12): elle diminue ainsi la concentration d' $O_2^{\cdot-}$ chloroplastique de 3 ou 4 ordres de grandeur, si on compare cette réaction avec le taux de dismutation spontanée (Bielski, 1978 *in* Polle, 1997).

H_2O_2 formé par la SOD, bien que beaucoup moins dangereux que les espèces radicalaires, est néanmoins toxique. Il est détoxiqué dans le plaste par l'action de l'ascorbate peroxydase (APX) (Hossain & Asada, 1984 *in* Foyer, 1997), dont 70 à 80% du pool cellulaire se situe dans le plaste. L'activité catalase, également efficace dans la détoxification des ROS, est par contre absente du compartiment plastidial (Asada, 1992).

Ainsi, lorsque l'on intègre les différents mécanismes de détoxification des ROS décrits précédemment et les réactions photosynthétiques, on se rend compte qu' H_2O est oxydé au niveau du PSII ("photolyse de l'eau") et est le produit final des réactions de détoxification des ROS : il existe donc un cycle de l'eau. Ainsi, l'énergie en excès de la phase lumineuse de la photosynthèse a servi ici à produire des ROS qui ont dû être détoxiqués par le chloroplaste, processus coûteux en pouvoir réducteur, ceci sans empêcher la formation d'ATP. On a ainsi ajusté le rapport ATP/NADPH, et permis la production d'ATP dans le plaste sans dommages collatéraux, et ceci dans une situation de stress intense pour la plante (Asada, 1999 ; Niyogi, 2000). Cet ATP va pouvoir servir à alimenter d'une part le cycle de Calvin, et d'autre part le cycle photorespiratoire. (Asada, 1999) Ce cycle de l'eau est finalement l'un des mécanismes permettant d'utiliser l'énergie en excès produite par la photosynthèse.

2) Les chromoplastes et les caroténoïdes

2.1) Les chromoplastes

Les chromoplastes se différencient à partir des chloroplastes dans les organes colorés de la plante (fleurs et fruits). Ils peuvent également être formés à partir d'autres formes de plastes, comme le proplaste et l'amyloplaste (Camara *et al.*, 1995). Dans un processus de différenciation classique, on observe une désorganisation des structures chloroplastiques suivie de changements métaboliques, le plus apparent étant une forte biosynthèse de caroténoïdes. La production de caroténoïdes en grande quantité semble désorganiser les systèmes membranaires, c'est pourquoi ces pigments sont stockés dans des structures stables de différents types. On observe ainsi des chromoplastes de type globulaire, cristallin, membranaire ou fibrillaire (pour revue : Camara *et al.*, 1995 ; Deruère *et al.*, 1994).

Chez *Narcissus pseudonarcissus*, une étape de la biosynthèse des caroténoïdes, la désaturation du phytoène (cf. fig 13 et §2.2.2) a été décrite comme liée à un chaîne respiratoire plastidiale impliquant la présence de quinone et d'une NAD(P)H dH (Nievalstein *et al.*, 1995) : il semblerait donc qu'à l'image de la chlororespiration dans le chloroplaste, il soit possible de décrire une chromorespiration au sein du chromoplaste.

2.2) Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules terpéniques à 40 carbones caractérisées par leur longue chaîne carbonée à doubles liaisons conjuguées. Ce chromophore détermine les propriétés spectrales et donc les différentes fonctions de ces pigments au sein de la plante.

2.2.1) Rôles des caroténoïdes

Les caroténoïdes possèdent plusieurs rôles au sein des membranes plastidiales, dont certains sont fondamentaux pour la vie de la plante.

Dans le chloroplaste, ils prennent part à la photosynthèse et sont présents au sein des ensembles protéines-pigments que sont les photosystèmes. Ils participent alors à la collecte de la lumière dans les LHC, permettant un flux d'énergie vers les chlorophylles (Britton, 1995). Ils sont également les acteurs majeurs de la détoxification des ROS au niveau du PSII, grâce à leur efficacité de "quencher" des molécules telles que $^1\text{O}_2$ (cf. §1.3.3). Ils ont également un rôle clef dans la photoprotection en facilitant la dissipation thermique de l'énergie avec le cycle des xanthophylles (cf. §1.3.2), et en participant à la stabilisation des membranes biologiques (Havaux, 1998 ; Tardy & Havaux, 1997). La présence des caroténoïdes fonction est essentielle à la survie de la plante, puisque l'interruption de la voie de biosynthèse des caroténoïdes conduit à un blanchiment des plantes en présence de lumière et à terme à leur destruction (Bartley *et al.*, 1994 ; Carol *et al.*, 1999 ; Scolnik *et al.*, 1987 ; Simkin *et al.*, 2000). Enfin, les caroténoïdes, outre ces fonctions liées à la photosynthèse, sont également les précurseurs de l'acide abscissique (fig 13).

Dans le chromoplaste, les caroténoïdes donnent leur couleur aux fruits et aux fleurs. La couleur vive ainsi obtenue est attractive pour les insectes pollinisateurs et les animaux consommateurs de fruits, favorisant ainsi la reproduction des plantes et la dissémination des graines.

2.2.2) Biosynthèse des caroténoïdes (fig 13)

Elle a lieu dans le plaste, les premières enzymes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes étant solubles et localisées dans le stroma du plaste (Sandmann, 1994), les suivantes dans les membranes internes du plaste. A partir d'un précurseur à 5 carbones, l'isopentényl pyrophosphate (IPP), synthétisé soit à partir de l'acétyl-CoA (voie du mévalonate dans le cytosol, Kleinig, 1989 *in* Cunningham & Gantt, 1998), soit à partir du glyceraldéhyde-3-phosphate (voie de Rohmer dans le plaste, Rohmer *et al.*, 1996 *in* Cunningham & Gantt, 1998), et condensé sur son isomère le diméthyl allyl diphosphate, la géranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) (Kuntz *et al.*, 1992) permet la formation de GGPP, molécule à 20 carbones. 2 molécules de GGPP sont alors condensées par la phytoène synthase (PSY) pour former le phytoène, premier caroténoïde à être

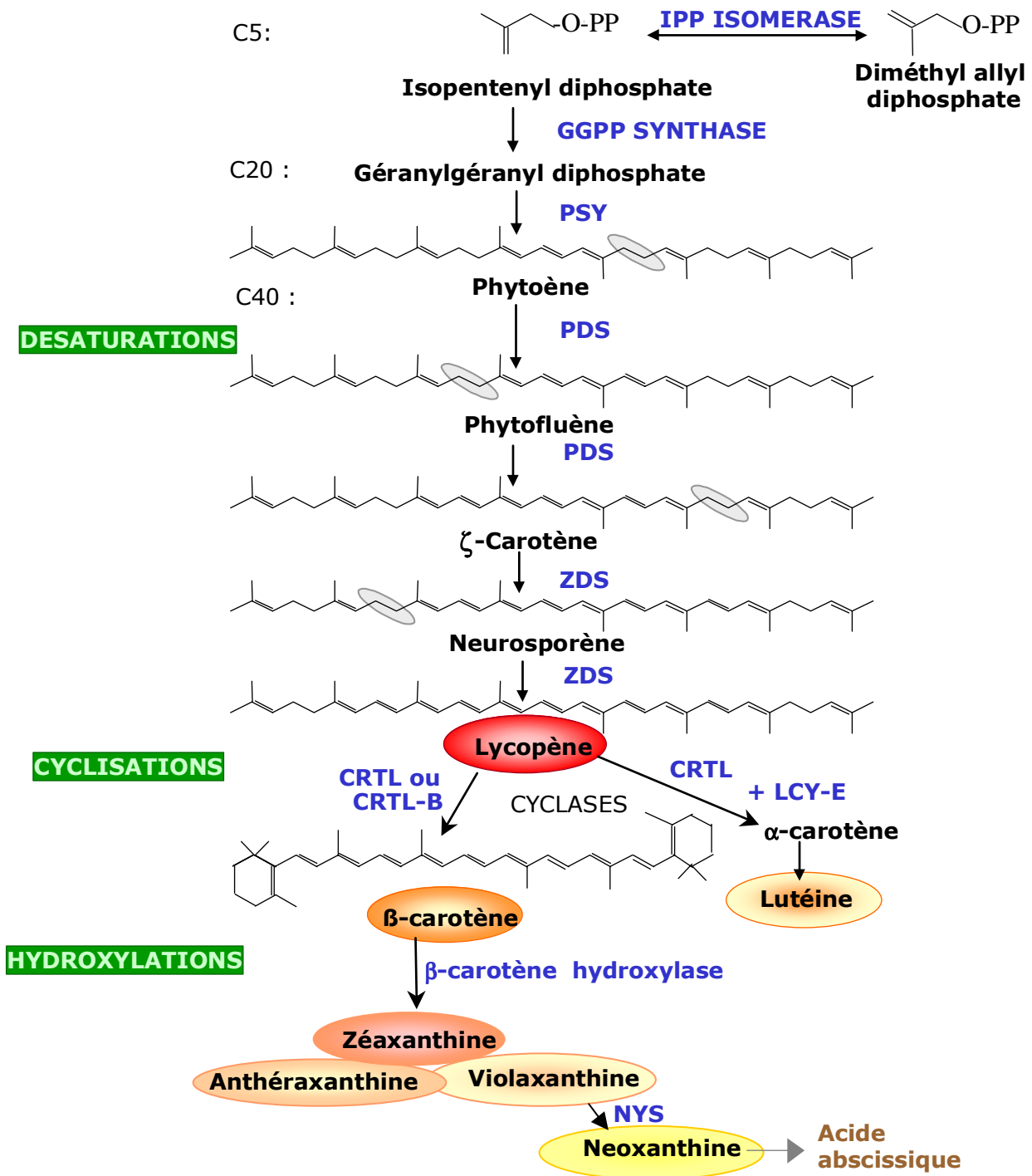


Fig 13: La voie de biosynthèse des caroténoïdes : après la formation du phytoène, premier caroténoïde, des étapes de désaturation sont suivies par des cyclisations (formation de cycles en bout de chaîne), et enfin des hydroxylations conduisant à la production des Xanthophylles.

synthétisé (Bartley *et al.*, 1992). La phytoène désaturase (PDS) et la ζ -carotène désaturase (ZDS), enzymes associées aux membranes, catalysent les réactions successives de désaturation du phytoène en lycopène (Albretsch *et al.*, 1995 ; Bartley *et al.*, 1992 ; Cunningham & Gantt, 1998).

Ces 4 réactions de désaturation catalysées par la PDS et la ZDS nécessitent plusieurs co-facteurs dans le plaste : un intermédiaire redox entre les désaturases et l'O₂ (Beyer *et al.*, 1989) ainsi que des quinones (Mayer *et al.*, 1990 ; 1992 ; Schulz *et al.*, 1993), l'absence de quinones chez un mutant conduisant ainsi à l'accumulation de phytoène (Norris *et al.*, 1995). Ces étapes de désaturation ne sont pas thermodynamiquement favorables et doivent être couplées à la réduction de plastoquinone pour avoir lieu (Bennoun, 2001).

Si le lycopène s'accumule en grande quantité dans les fruits de tomates, dans la plupart des autres tissus, le lycopène est modifié en caroténoïdes cycliques : la lycopène β cyclase (CTRL ou CTRL-B) forme seule le β -carotène (Cunningham *et al.*, 1996) alors que la lycopène ϵ cyclase participe avec la lycopène β cyclase à la formation l' α -carotène, précurseur de la lutéine (Sandmann, 1994).

A partir du β -carotène, la β -carotène hydroxylase produit la zéaxanthine, caroténoïde xanthophylle (Sandmann, 1994), impliqué dans le cycle des xanthophylle (cf fig 11 et §1.3.2), participant à la prévention de la photoinhibition.

Enfin, la néoxanthine formée à partir de la violaxanthine par la néoxanthine synthase (Al-Babili *et al.*, 2000 ; Bouvier *et al.*, 2000) est le précurseur de l'acide abscissique (Iuchi *et al.*, 2001 ; Schwartz *et al.*, 1997 ; 2001).

2.2.3) Régulations de la voie de biosynthèse des caroténoïdes

La voie de biosynthèse des caroténoïdes est très active au cours de la formation du chromoplaste. L'activation de la biosynthèse des caroténoïdes au cours de la maturation du fruit est due au moins en partie à l'expression de gènes induits par l'éthylène (Giovannoni, 2001 ; Kuntz *et al.*, 1998). Il semblerait également qu'il existe une activation directe de la biosynthèse des caroténoïdes par la lumière, activation relayée par un signal phytochrome, (Alba *et al.*, 2000 ; Peters *et al.*, 1998 ; von Lintig *et al.*, 1997), ce signal permettant l'accumulation de lycopène indépendamment de la réponse éthylène, mais ne constituant pas le régulateur global de la maturation (Alba *et al.*, 2000). De plus, le quantité de caroténoïdes augmente énormément au cours de la dé-étiolation des jeunes pousses, et des mutants déficients en phytochrome ont une composition en caroténoïdes altérée dans les feuilles (Bartley *et al.*, 1994).

Le stress photooxydant peut également jouer un rôle dans l'activation de la biosynthèse des caroténoïdes (Bartley *et al.*, 1994 ; Kuntz *et al.*, 1998). En effet, les transcrits *pds* et *psy* sont présents en abondance suite à un traitement par des herbicides inhibiteurs de la biosynthèse des caroténoïdes chez la tomate (Giuliano *et al.*, 1993 ; Simkin, 2002) –mais pas chez le poivron (Simkin *et al.*, 2000) ni chez *Arabidopsis* (Wetzel & Rodermel, 1998)- ce qui peut être interprété comme un effet de la photooxydation sur les gènes de biosynthèse des caroténoïdes. Cependant, le promoteur *pds* peut être induit à l'obscurité chez le tabac et la tomate (Corona *et al.*, 1996 ; Simkin, 2002), excluant ainsi le seul

effet d'un stress photooxydant. De plus, un traitement par un inhibiteur de la voie de biosynthèse de la chlorophylle, la gabaculine, conduisant à une diminution du contenu en caroténoïdes cycliques, amène à une augmentation de l'expression de pds (Corona *et al.*, 1996) : ceci suggère un rôle de la teneur en caroténoïdes sur l'expression des gènes de la biosynthèse des caroténoïdes, exerçant un rétro-contrôle sur leur propre synthèse. Cette hypothèse est également intéressante pour expliquer les fluctuations observées de façon journalière (Simkin, 2002).

3) Le mutant *immutans*

La première apparition du mutant *immutans* (*im*) d'*Arabidopsis thaliana* dans la littérature remonte à près de 40 ans. C'est effectivement en 1963 que Rédei décrit ce mutant au phénotype panaché, qui possède la particularité de voir sa proportion de secteurs verts s'accroître lorsqu'il pousse en présence de cystéine (fig 14) (Rédei, 1963 *in* Rodermel, 2002). Les descriptions et caractérisations partielles qui suivront par Rédei, Röbbelen et leurs collaborateurs (Chung & Rédei, 1974 ; Chung *et al.*, 1974 ; Rédei, 1967a ; 1967b ; 1967c ; 1975 ; Röbbelen, 1968 ces références *in* Rodermel, 2002) montrent qu'*im* est une mutation nucléaire et récessive, affectant la couleur des plastes. La proportion de secteurs blancs est plus importante lorsque la plante pousse à température élevée, ou à de fortes intensités lumineuses (Rédei, 1963 ; Röbbelen, 1968 ces références *in* Rodermel, 2002). Lorsque les plastes de ce mutant ont acquis un caractère vert (d'aspect sauvage), ou blanc, il est impossible d'obtenir une réversion de ce caractère, d'où le nom de ce mutant, *immutans*, pour "immutable" (immuable en français) (Rédei, 1975 *in* Rodermel, 2002).

Fig 14:

Le mutant d'Arabidopsis thaliana immutans, au phénotype panaché, décrit par Rédei dès 1963. Photographie d'après Wu et al., 1999



En 1994, Wetzel et ses collaborateurs montrent que les secteurs blancs de *im* ont un contenu en plastes hétérogène : dans ces cellules se côtoient des plastes anormaux, blancs, et des chloroplastes apparemment normaux. Ceci a conduit à qualifier ce phénotype de "plaste autonome" (Wetzel *et al.*, 1994). L'idée a alors été développée qu'il devait exister une dose seuil d'un élément inconnu, que seuls les plastes verts dans ce mutant avaient reçue.

Dans cette même étude, Wetzel et ses collaborateurs ont montré que les secteurs blancs de *im* accumulent du phytoène (fig 15), un précurseur non coloré des caroténoïdes. L'activité de la PDS, convertissant le phytoène en ζ -carotène (Bartley *et al.*,

1991) doit donc être bloquée chez ce mutant. Cependant, des études génétiques ont mis en évidence que le gène muté chez *im* ne correspond pas au gène codant pour la PDS (Wetzel *et al.*, 1994), et de plus, le mutant *im* possède une quantité de transcrits *pds* et de protéine PDS normale (Wetzel & Rodermel, 1998).

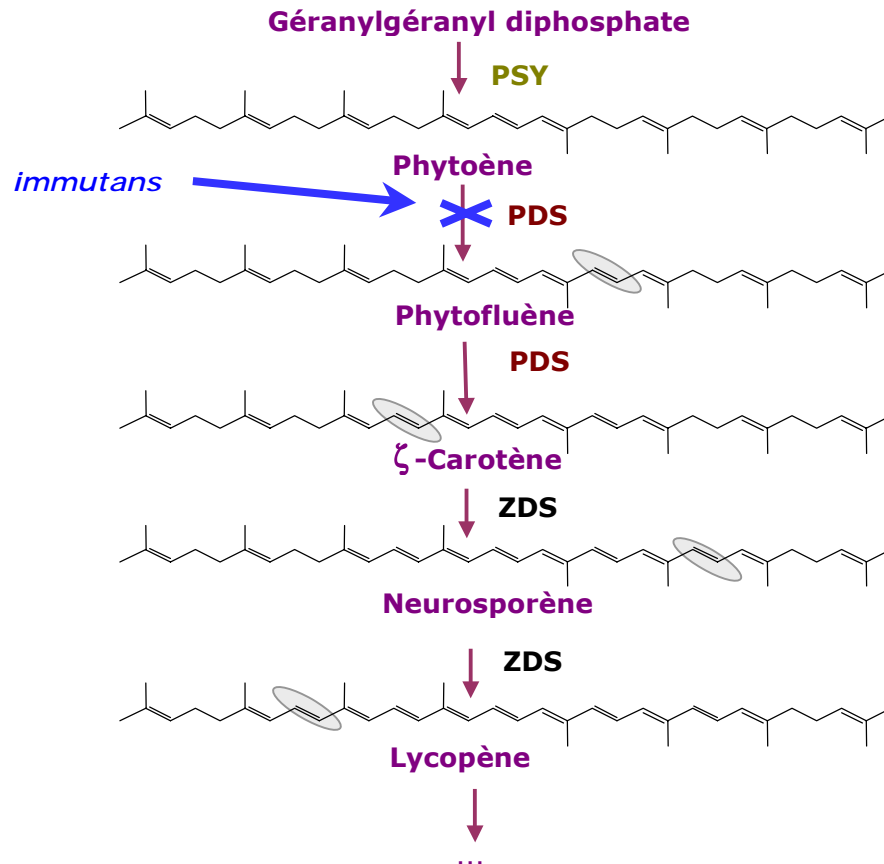


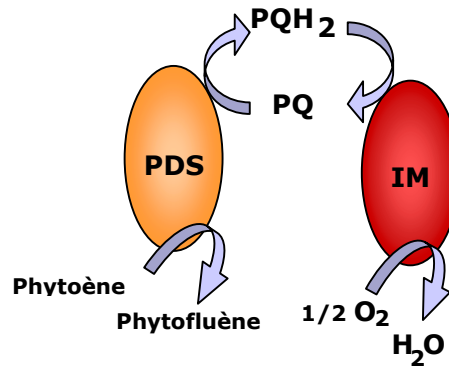
Fig 15: Les étapes de désaturation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. La réaction catalysée par la PDS est bloquée chez le mutant *immutans*, et ses secteurs blancs accumulent du phytoène.

Le blocage de la biosynthèse des caroténoïdes dans les tissus blancs de *im* a amené à penser à un problème de photooxydation de la chlorophylle et de destruction des chloroplastes (Oelmüller, 1989 *in* Rodermel, 2002) pour ce mutant, puisque les pigments protecteurs des chlorophylles que sont les caroténoïdes ne sont plus là pour assurer la photoprotection des antennes collectrices. Cette explication est d'autant plus convaincante que la proportion des secteurs blancs augmente avec l'élévation de l'intensité lumineuse, source de pression photooxydante.

Un bond dans la compréhension de ce phénotype a été effectué en 1999, avec le clonage du gène *IM* (Carol *et al.*, 1999 ; Wu *et al.* 1999), qui a révélé des homologies significatives entre le produit codé par ce gène et l'AOX, l'oxydase alterne mitochondriale (cf. §4). Il a donc naturellement été envisagé pour *IM*, à l'image de la fonction de l'AOX, un rôle redox dans le mécanisme de désaturation du phytoène, désaturation impliquant la PDS, le pool de plastoquinone et l'oxygène comme accepteur final d'électrons (Beyer *et al.*, 1989 ; Mayer *et al.*, 1990 ; 1992 ; Nievelstein *et al.*, 1995 ; Norris *et al.*, 1995 ; Schulz *et al.*, 1993). (fig 16)

Fig 16:

IM, "cofacteur" de la PDS, pourrait avoir une fonction de réoxydation du pool des plastoquinones, utilisant directement l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons, à l'image de l'AOX, son homologue mitochondrial.



Carol et ses collaborateurs ont montré par import *in organello* que la protéine IM peut être importée dans le plaste, et ont proposé pour elle un rôle de réoxydation du pool des plastoquinones, utilisant directement l'oxygène comme accepteur d'électrons. IM serait alors nécessaire à l'activité PDS, qui transmet les électrons de la désaturation du phytoène vers le même pool de plastoquinones (Carol *et al.*, 1999). Cette hypothèse permet d'expliquer le phénotype panaché de *im* : le pool des plastoquinones est couramment oxydé au cours de la photosynthèse par l'action du cytochrome b6/f. Ainsi, la chaîne de transport d'électrons photosynthétique pourrait pallier à l'absence de IM pour permettre à la PDS de trouver de la plastoquinone oxydée, prête à accueillir les électrons de la désaturation du phytoène. Tout se passe sans problème dans le chloroplaste, qui est alors bien vert. Mais, encore faut-il que cette chaîne photosynthétique soit en place... (fig 17)

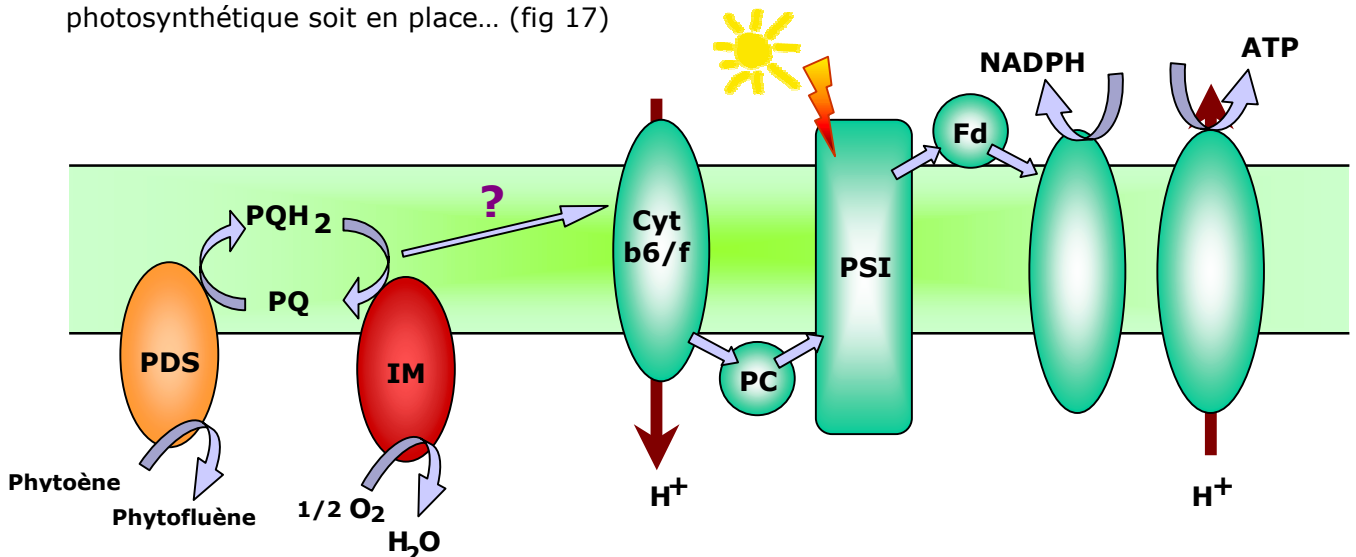


Fig 17: Comment expliquer la présence de secteurs verts chez le mutant *immutans*: la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques, après sa mise en place, pourrait pallier à l'absence de IM en réoxydant le pool des plastoquinones, fournissant ainsi à PDS un accepteur d'électrons, nécessaire à la production des précurseurs de caroténoïdes.

On peut ainsi expliquer le devenir "immuable" des chloroplastes du mutant *im* : si la "pression" de stress oxydant est faible lors de la formation du chloroplaste (une lumière faible, une température adéquate, une présence renforcée d'anti-oxydants dans le milieu de culture...), alors d'une part le besoin en caroténoïdes photoprotecteurs est faible, d'autre part l'appareil photosynthétique peut se mettre en place sans aussitôt être détruit. Il peut alors suppléer (plus ou moins efficacement) la fonction de IM. Si au

contraire la "pression" de stress oxydant est forte, l'appareil photosynthétique se détruit aussitôt ébauché, en l'absence de protection par les caroténoïdes, incapables de se former puisque l'appareil photosynthétique n'est pas fonctionnel : on obtient des plastes blancs. (Carol *et al.*, 1999 ; Rodermel, 2002 ; Wu *et al.*, 1999).

Cette hypothèse est en accord avec le profil d'expression de IM, qui est exprimé très tôt au cours du développement du cotylédon (Aluru *et al.*, 2001), et explique également le caractère "plaste autonome" de la mutation. Cependant, le risque de photooxydation étant l'étape critique à chaque nouvelle division plastidiale, lorsqu'un plaste vert se divise, il existe logiquement une probabilité plus forte pour qu'il engendre 2 plastes fils verts, puisqu'une quantité non négligeable de matériel photosynthétique préexiste déjà dans ces nouveaux chloroplastes. (Wu *et al.*, 1999).

En plus de son rôle dans la biosynthèse des caroténoïdes, IM pourrait également être l'oxydase chloroplastique permettant de terminer la chaîne respiratoire plastidiale de la chlororespiration (Bennoun, 1982 ; cf §1.2.2).

4) L'Oxydase alternative mitochondriale : origine, régulations et fonctions.

4.1) La voie résistante au cyanure

C'est en 1929 que Genevois décrit pour la première fois que la respiration des plantes est partiellement résistante au cyanure (Genevois, 1929 *in* Affourtit *et al.*, 2002). Cependant, il faudra attendre la fin des années 1970 pour pouvoir attribuer ce phénomène à une protéine en particulier : l'oxydase alternative mitochondriale (AOX) (Huq & Palmer, 1978 ; Rich, 1978, ces références *in* Vanlerberghe & McIntosh, 1997). Depuis lors, cette enzyme mitochondriale codée par le génome nucléaire a été identifiée chez la totalité des plantes supérieures étudiées, chez de nombreuses algues, des champignons et des levures (Affourtit *et al.*, 2002 ; Umbach & Siedow, 2000), mais elle n'existe pas chez les animaux. L'AOX constitue donc une enzyme clef de la respiration chez les plantes.

La respiration permet, à partir de la dégradation de matière carbonée, la production d'ATP, cette dernière étape constituant l'aboutissement de la chaîne de transfert d'électrons qui a lieu dans la membrane interne de la mitochondrie. A partir du pyruvate, le cycle de Krebs fournit de l'énergie sous forme de donneurs d'électrons (NADH, NADPH, succinate) aux premiers intervenants de la chaîne de transfert d'électrons, qui vont aller réduire le pool d'ubiquinone, pool réoxydé à son tour par le complexe III, puis le complexe IV. Ces transferts d'électrons permettent une translocation de protons de la matrice en direction de l'espace intermembranaire, ces H⁺ étant utilisés par l'ATPsynthase pour produire de l'ATP (fig 18).

La voie dite alternative de la respiration mitochondriale se branche au niveau du pool d'ubiquinone, l'enzyme étant capable de réoxyder ce dernier en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons (pour revue : Affourtit *et al.*, 2001 ; 2002 ; Mackenzie & McIntosh, 1999 ; McIntosh, 1994 ; Siedow & Umbach, 1995 ; Vanlerberghe & McIntosh, 1997).

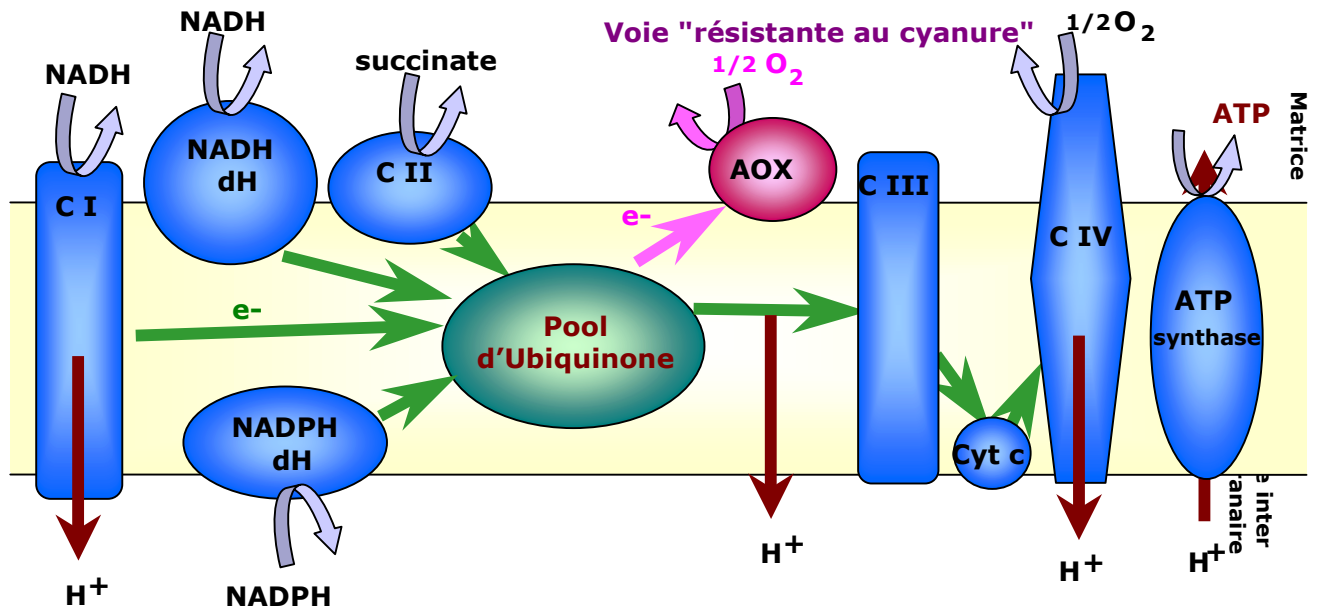


Fig 18: La chaîne de transport d'électrons respiratoires de la mitochondrie végétale: 2 voies parallèles sont capables de réoxyder le pool d'ubiquinone: la voie des cytochromes, phosphorylante car elle permet l'établissement du gradient de pH, et la voie de l'AOX, non phosphorylante et résistante au cyanure.

En court-circuitant la chaîne de transfert d'électrons avant l'intervention du complexe III, l'AOX constitue une voie non phosphorylante, puisqu'elle ne contribue pas à l'établissement du gradient de pH transmembranaire. L'AOX est insensible au cyanure, et inhibée par l'action du SHAM et du n-propyl gallate (Hoefnagel *et al.*, 1995 ; Schonbaum *et al.*, 1971 in Siedow & Bickett, 1981), les zones de sensibilité à ces 2 inhibiteurs étant distinctes sur la protéine, d'après des études de mutagenèse dirigée (Berthold, 1998). L'AOX, contrairement à la voie des cytochromes, est également insensible au monoxyde d'azote (NO) (Millar & Day, 1996).

Dans un premier temps considérée comme une curiosité permettant la production de chaleur chez les *Arum* (Meeuse, 1975 in Day *et al.*, 1995 ; Skubatz *et al.*, 1991 in Vanlerberghe & McIntosh, 1997) afin d'attirer les insectes pollinisateurs (phénomène décrit dès 1815 par Lamarck), la présence de cette enzyme dans tout le règne végétal, y compris chez les espèces non thermogènes, a suggéré à la communauté scientifique un rôle certainement plus général de l'AOX dans la physiologie de la plante.

La façon dont est régulée l'AOX, aussi bien d'un point de vue génétique que biochimique, a permis d'envisager pour elle une fonction de "valve de sécurité" mitochondriale, agissant lorsque la charge énergétique de la cellule est élevée, autrement dit lorsque la quantité d'ubiquinone réduite, de NADPH mitochondrial ou de pyruvate est importante (Vanlerberghe & McIntosh, 1996 ; 1997). Ceci aboutit *in fine* à une réduction significative de la production de molécules d'oxygène réactif (ROS) par la mitochondrie grâce à l'action de l'AOX (Maxwell *et al.*, 1999).

D'un point de vue génétique, il semble que selon les espèces, il existe plusieurs copies de gène codant pour l'AOX. On en dénombre ainsi au moins 2 chez le tabac et 3 chez le

soja, avec une expression différentielle selon les organes. (Vanlerberghe & McIntosh, 1997)

4.2) Activité enzymatique de l'AOX

L'AOX est une ubiquinol-oxygène oxydoréductase : elle réduit l'O₂ en H₂O par un mécanisme utilisant 2 électrons qui lui sont fournis par 2 ubiquinols. Après avoir modélisé la structure de l'AOX suite à la comparaison d'un grand nombre de séquences d'AOX de différentes espèces (Andersson & Nordlund, 1999 ; Berthold *et al.*, 2000 ; Berthold et Stenmark, 2003) Moore & Siedow, 1991 ; Moore *et al.*, 1995 ; Siedow *et al.*, 1995 ; cf. chapitre I), il est apparu que l'AOX est une protéine à centre Fer-Fer similaire à la méthane monooxygénase (MMO) et à la sous-unité R2 de la ribonucléotide réductase (RNR R2), dont les mécanismes enzymatiques ont été étudiés en détail. Cette modélisation a été confirmée récemment par une analyse RPE de l'AOX (Berthold *et al.*, 2002) Un mécanisme de catalyse de la réaction de réduction de l'O₂ a donc été proposé pour l'AOX (Berthold *et al.*, 2000 ; fig 19)

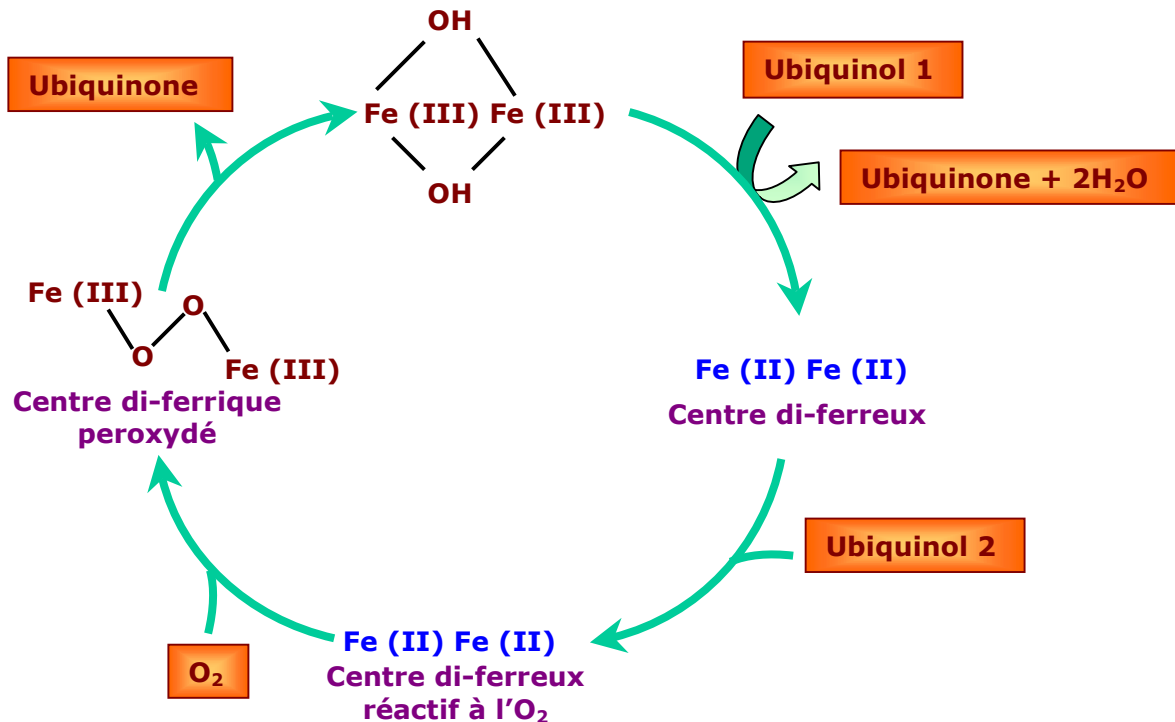


Fig 19: Cycle catalytique de l'AOX, basé sur sa similarité avec les protéines à 2 Fer du type R2. D'après Berthold *et al.*, 2000.

Ainsi, dans la première étape, le centre Fer-Fer sous forme di-ferrique est réduit par un quinol pour donner un centre di-ferreux, qui fixe alors un autre quinol. Après la fixation de l'O₂, les 2 électrons sont immédiatement transférés par ce centre Fer-Fer pour former un stade intermédiaire peroxy-Fe(III). Ce stade intermédiaire a été isolé chez la MMO et R2, et pourrait chez l'AOX directement oxyder les ubiquinols, formant ainsi une liaison entre le centre et de résidus hydroxyles.

Il est probable que les 2 quinols se fixent et fournissent leurs électrons au centre réactionnel avant l'arrivée de l'O₂ sur l'enzyme, afin d'empêcher une réduction

incomplète de cet O₂ qui pourrait conduire à la production de molécules d'oxygène réactives hautement toxiques. Quant à la fixation des quinols, aucune donnée ne permet actuellement de savoir s'il existe 2 sites quinols sur l'AOX, ou si les 2 ubiquinols se fixent de façon séquentielle sur l'AOX.

4.3) Régulation de l'expression de l'AOX (fig 20)

Puisqu'il pourrait exister un état de compétition entre la voie "classique" des cytochromes, phosphorylante, et l'AOX, compétition capable d'affecter l'efficacité de la respiration, il est nécessaire que l'abondance et l'activité de cette enzyme soient très finement contrôlées, suivant les besoins métaboliques de la cellule (Vanlerberghe & McIntosh, 1992). Ainsi, l'inhibition chimique de la voie des cytochromes par l'antimycine A peut induire la synthèse de l'AOX chez plusieurs organismes (Benichou *et al.*, 1988 ; Sakajo *et al.*, 1991 ; ces références *in* Vanlerberghe & McIntosh, 1997). Vanlerberghe & McIntosh ont ainsi montré une augmentation importante de la transcription du gène *Aox1* et de la synthèse de la protéine dans des suspensions de cellules de tabac traitées à l'antimycine A (Vanlerberghe & McIntosh, 1992 ; 1994).

La façon dont le gène *Aox1* de tabac est activé n'est pas connue, mais, il est probable, à l'image de la régulation des gènes *cab* par l'état redox du pool des plastoquinones (Escoubas *et al.*, 1995) que ce gène soit la cible d'un signal redox, relayé par une voie de transduction impliquant des cascades de phosphorylation/déphosphorylation (Allen, 1993 ; Allen *et al.*, 1995 ; Hakansson & Allen, 1995). Ce signal pourrait impliquer l'action d'un "redox sensor", tout comme celui retrouvé dans le signal de transduction "à 2 composantes" chez la bactérie (pour revue : Igo *et al.*, 1990). En effet, certaines études phylogénétiques ont montré que le même type de système, impliquant une histidine kinase et un régulateur pourrait exister dans la mitochondrie et le chloroplaste (Forsberg *et al.*, 2001). Chez *Rhodobacter sphaeroïdes*, ce système d'activation à 2 composantes (Eraso & Kaplan, 1994 ; 1996 ; Joshi & Tabita, 1996) peut être activé par l'action d'une oxydase terminale (O'Gara *et al.*, 1998 ; Oh & Kaplan, 1999 ; Oh *et al.*, 2000), capable de transmettre un signal aux gènes responsables de ce système, selon l'intensité du flux d'électrons qui la traverse (Oh & Kaplan, 2000), et ceci sans l'intervention de ROS comme messagers cellulaires. En s'inspirant de ce système, on pourrait donc imaginer une activation directe de gène *Aox1* lorsque le flux d'électrons passant dans la chaîne de transfert mitochondriale est particulièrement élevé.

Il est également possible, cette hypothèse n'excluant pas la précédente, que le signal redox activant *Aox1* implique l'intervention de ROS (Kamata & Hirata, 1999 ; Maxwell *et al.*, 1999). Plusieurs études suggèrent d'ailleurs que ces molécules pourraient être les acteurs principaux d'une voie de signalisation et de communication essentielle entre les organites et le noyau (Manac'h & Kuntz, 1999 ; Sen & Packer, 1996). Ceci est également possible pour la mitochondrie puisque la respiration est une source importante de production de ROS *in vivo* (Longo *et al.*, 1996 ; Møller, 2001 ; Richter & Schweitzer, 1997). De plus, des traitements au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) induisent la voie de l'AOX (Vanlerberghe & McIntosh, 1996 ; Wagner, 1995), ainsi que sa synthèse (Maxwell *et al.*, 2002) et, d'autre part, l'inhibition de la voie des cytochromes par l'antimycine A

augmente sensiblement la production de ROS (Minagawa *et al.*, 1992 in Vanlerberghe & McIntosh, 1997), mais également le niveau de réduction du pool d'ubiquinone.

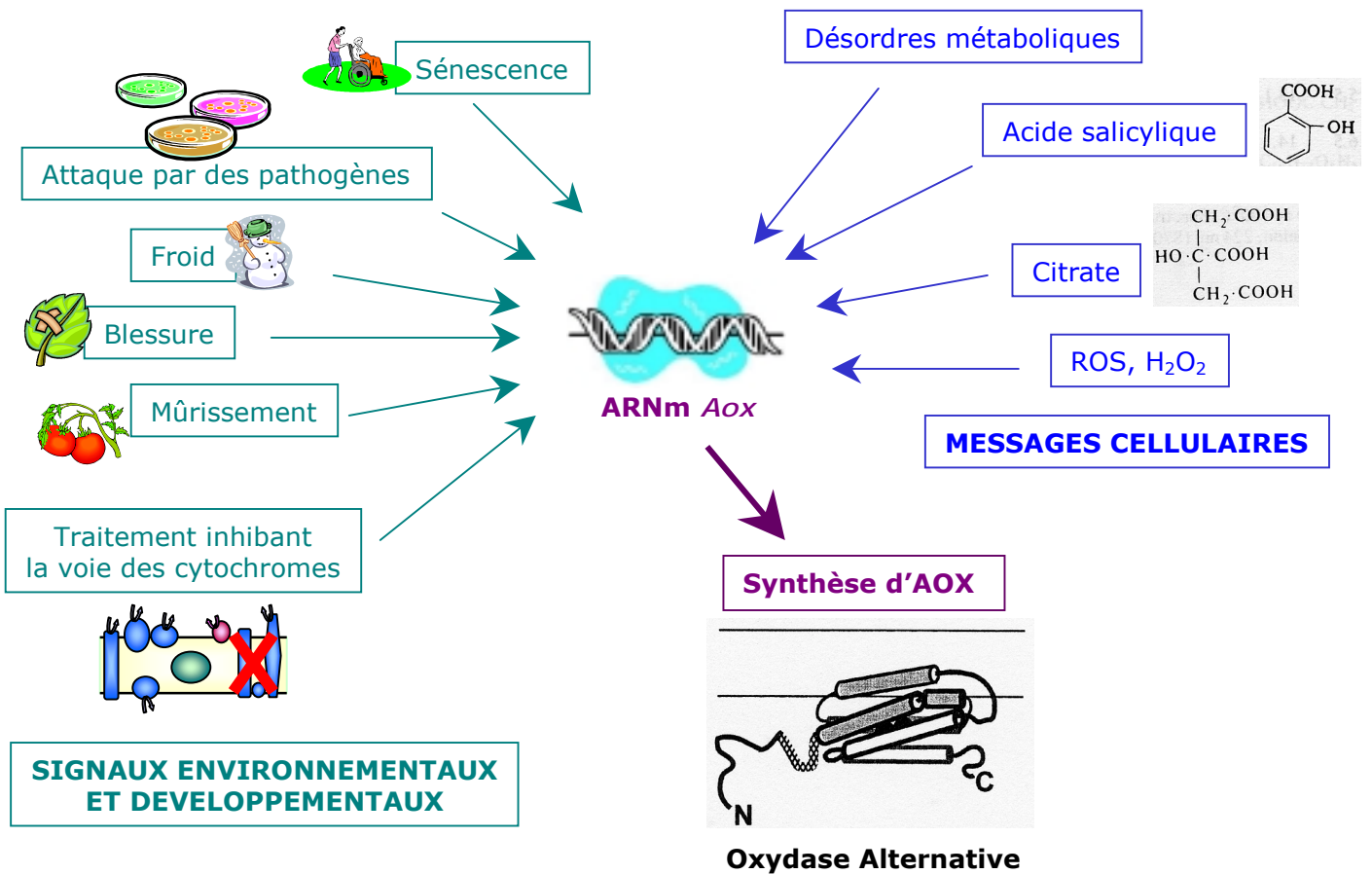


Fig 20: Régulation de l'expression de l'AOX. Des signaux environnementaux et développementaux ainsi que certaines molécules, probablement messagers cellulaires impliqués dans ces signaux, sont capables d'activer la transcription des gènes codant pour l'AOX.

L'expression de l'AOX semble également être sous le contrôle des métabolites clés du métabolisme mitochondrial. Ainsi, une accumulation de l'ARNm *Aox1* est notable en présence de citrate, intermédiaire du cycle de Krebs, dans des suspensions cellulaires de tabac (Vanlerberghe & McIntosh, 1996), et une augmentation de la synthèse de l'AOX sous l'effet du citrate a été reportée chez le Paturin (*Poa annua*) (Millenaar *et al.*, 2002). Une forte quantité de citrate présente à un instant donné signifiant un fort apport énergétique vers la mitochondrie, donc la possibilité d'une dérégulation du métabolisme si l'énergie en trop n'est pas canalisée, l'AOX semblerait effectivement bien répondre aux besoins d'urgence, afin d'éviter ou d'enrayer rapidement l'apparition d'un désordre dans le métabolisme mitochondrial. Dans un autre registre, Aubert et ses collaborateurs ont montré une induction importante de l'AOX dans des suspensions de cellules d'érable traitées par un herbicide entraînant une inhibition de la production d'acides aminés branchés. L'origine de cette induction ne serait pas due à l'herbicide lui-même, mais une

fois de plus aux désordres métaboliques provoqués par ce traitement (Aubert *et al.*, 1997).

Des conditions de stress ou de développement sont également capables d'avoir une incidence sur la quantité d'AOX présente dans la mitochondrie (Affourtit *et al.*, 2001 ; Siedow & Umbach, 1995 ; Vanlerberghe & McIntosh, 1997). Ainsi, le froid (Gonzalez-Meler *et al.*, 1999 ; Vanlerberghe & McIntosh, 1992), la blessure, la sénescence (Hiser *et al.*, 1996), le développement floral, le mûrissement du fruit (Cruz-Hernandez & Gomez-Lim, 1995), l'acide salicylique (Kapulnik *et al.*, 1992 ; Rhoads & McIntosh, 1992 ; 1993), H₂O₂ (Maxwell *et al.*, 2002) ainsi que l'attaque par des agents pathogènes (Chivasa & Carr, 1998 ; Murphy *et al.*, 1999 ; Simons *et al.*, 1999) ont un effet positif sur l'expression de l'AOX. Dans la plupart de ces situations, des ROS semblent être impliqués.

4.4) Régulation de l'activité de l'AOX

En plus de ces régulations permettant de déterminer la quantité d'AOX présente dans la mitochondrie, il existe également une régulation plus rapide, sous contrôle métabolique, de l'activité enzymatique de cette dernière.

Le niveau de réduction du pool d'ubiquinone est ainsi le facteur essentiel régulant l'activité de l'AOX (Day *et al.*, 1995 ; Hoefnagel & Wiskich, 1998 ; Siedow & Umbach, 1995 ; Vanlerberghe & McIntosh, 1997). En effet, l'AOX ne se retrouve activée qu'en présence de 40 à 50% du pool d'ubiquinone réduit (Day *et al.*, 1995 ; Dry *et al.*, 1989 ; Moore *et al.*, 1988 ; Siedow & Moore, 1993). D'autre part, l'addition de KCN ou d'antimycine A, inhibiteurs de la voie des cytochromes, permettent une activation de l'AOX (Bahr & Bonner, 1973 *in* Siedow et Umbach, 1995 ; Day *et al.*, 1995). A l'inverse, l'inhibition de l'AOX, elle, n'a pas d'incidence sur l'activité de la voie des cytochromes. Ces résultats ont les premiers mis en avant le rôle de "valve de sécurité" de l'AOX, fonctionnant en cas de "surcharge" de la voie des cytochromes. Dans la mitochondrie, le degré de réduction du pool des quinones dépend de l'état énergétique de la cellule, et la quantité d'ubiquinone au sein de la mitochondrie est également un facteur important influençant l'activité de l'AOX (Ribas-Carbo *et al.*, 1995)

Millar et ses collaborateurs ont les premiers décrit une régulation allostérique de l'AOX par le pyruvate (Millar *et al.*, 1993). L'addition de pyruvate exogène a pour effet d'augmenter l'affinité de l'AOX pour l'ubiquinone (Umbach *et al.*, 1994), cet effet pouvant se généraliser à d'autres acides α -cétoniques (fig 21) (Day *et al.*, 1994). Une activation de l'AOX par le pyruvate est en accord avec le rôle de ce dernier dans la cellule. Il a effectivement une place centrale dans le métabolisme de la mitochondrie, en étant un substrat du cycle de Krebs, des voies de fermentation et de la biosynthèse des acides aminés. D'autre part, il est synthétisé à partir du phosphoenolpyruvate par la pyruvate kinase, enzyme clef et point de régulation essentiel de la glycolyse (Plaxton, 1996 ; Vanlerberghe et McIntosh, 1997). Ainsi, la quantité de pyruvate dans la mitochondrie est une donnée intégrant de multiples voies métaboliques, et il est probable qu'il soit de ce fait un régulateur central des mécanismes enzymatiques de la mitochondrie

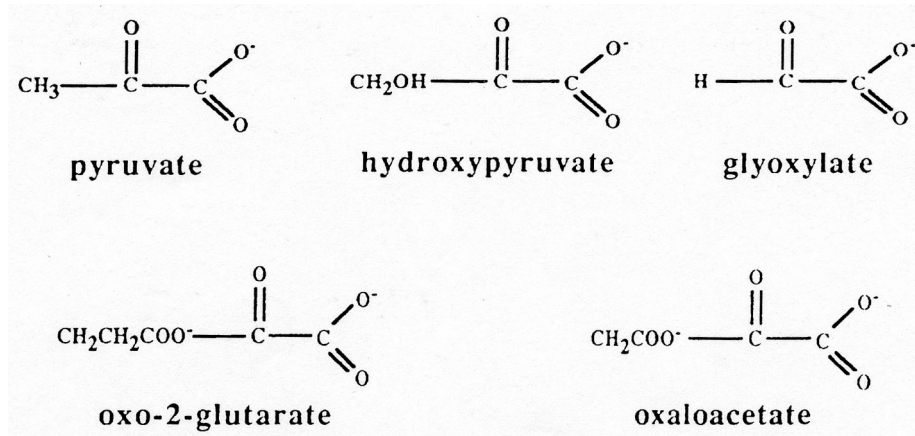


Fig 21: Acides organiques ayant un effet notable sur l'activité de l'AOX. Le motif structural requis est celui d'un acide α -cétonique, le plus simple étant le glyoxylate. La modification de ces structures par addition de groupements latéraux abaisse leur efficacité. D'après Day et al., 1995.

Puisque la présence d'acides α -cétoniques abaisse le Km de l'AOX pour l'ubiquinone, en présence de pyruvate, l'AOX et la voie des cytochromes entrent en compétition pour le flux d'électrons et pour la réoxydation du pool des quinones (Hoefnagel et al., 1995).

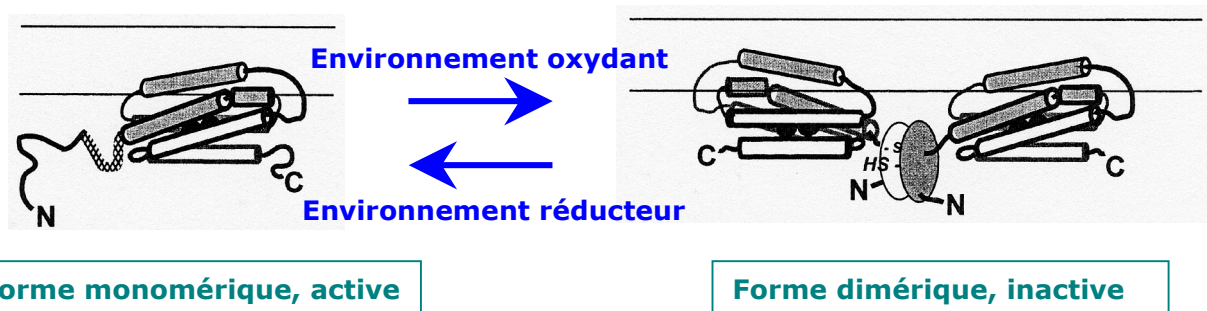


Fig 22: Selon l'état redox de son environnement, l'AOX peut se retrouver sous forme monomérique, réduite, ou sous forme dimérique, oxydée, les 2 sous-unités étant reliées par un pont di-sulfure au niveau de résidus de cystéine N-terminaux, la forme réduite ayant une activité plus importante. D'après Siedow & Umbach, 2000.

Il semblerait que l'état redox de l'AOX soit un élément important de sa régulation. En effet, Elthon et ses collaborateurs, après avoir produit des anticorps monoclonaux dirigés contre l'AOX, ont montré la présence de plusieurs bandes sur SDS-PAGE. (Elthon & McIntosh, 1987 ; Elthon et al., 1989). Mais c'est en 1993 qu'Umbach et Siedow ont pu corréliser ces tailles différentes à un état redox différent. Ils ont en effet montré que l'AOX, d'une taille d'environ 32 à 36kDa, donnait un signal correspondant à une taille de 60 à 70kDa sur SDS-PAGE en l'absence d'agent réducteur (Umbach & Siedow, 1993). Ils ont également montré dans la même étude une augmentation de l'activité de la voie de l'AOX en présence d'agents réducteurs, et, à l'opposé, une chute en présence d'agents oxydants, ceci dans des mitochondries isolées de *Sauromatum guttatum*, plante thermogène de la famille des Aracées. Ayant ainsi montré le caractère réversible des

ponts di-sulfures et leur effet sur l'activité de l'AOX, ils ont alors proposé un modèle dans lequel une forme réduite, monomérique de l'AOX serait plus active que sa forme oxydée, dimérique (Umbach & Siedow 1993). (fig 22). Les AOX, en tout cas les AOX de provenance végétales, seraient donc capables de former des dimères, les 2 sous-unités étant reliées par un pont di-sulfure entre des résidus de cystéine N-terminaux hautement conservés d'après les analyses de séquences des différents ADNc clonés (Day *et al.*, 1995).

Une synergie entre la régulation par la dimérisation et la régulation par les acides α -cétoniques a été suggérée par l'observation d'une stimulation plus forte de l'AOX par le pyruvate lorsqu'elle est sous forme réduite donc monomérique (Umbach *et al.*, 1994 ; Vanlerberghe *et al.*, 1995) (fig 23).

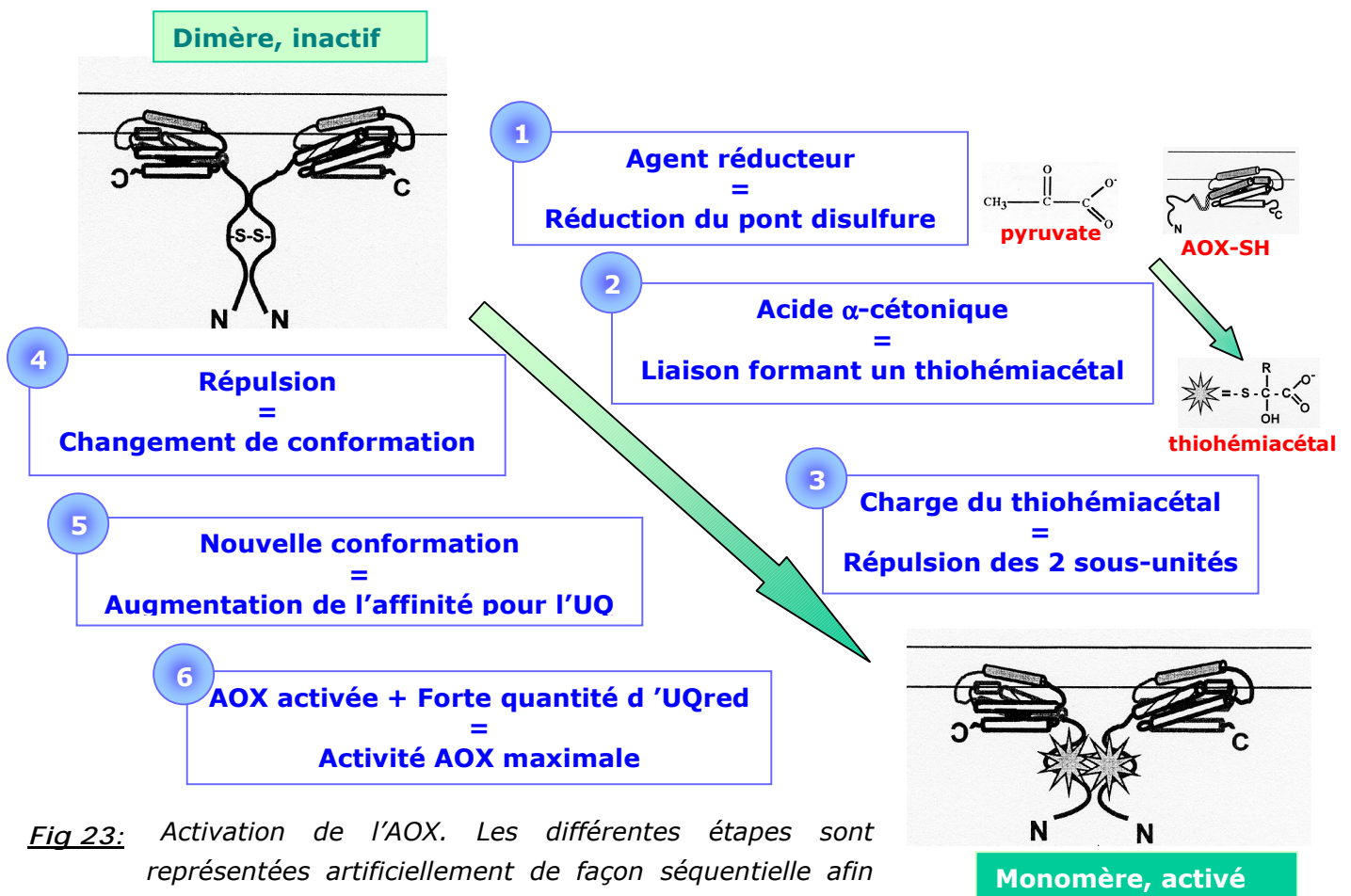


Fig 23: Activation de l'AOX. Les différentes étapes sont représentées artificiellement de façon séquentielle afin de faciliter la compréhension de cette régulation, et ce schéma montre le "cas idéal". Cependant, un monomère non activé par un acide α -cétonique, mais mis en présence d'une très forte quantité d'ubiquinone réduite, sera également actif. L'activation par l'acide α -cétonique semble essentiellement avoir un effet sur l'affinité de l'AOX pour l'ubiquinone. Croquis de l'AOX d'après Umbach & Siedow, 2000.

Lorsque le dimère est constitué, peu, voire aucune stimulation n'est visible, ce qui suggère une interaction des acides α -cétoniques au niveau des groupements sulfhydryque (-SH) (Umbach & Siedow, 1996), certainement via la formation d'un thiohémiacétal, suite à la réaction de l'acide α -cétonique sur le groupement -SH d'un résidu de cystéine

(Siedow & Umbach, 2000). La cystéine impliquée dans la formation de ce thiohémiacétal a été identifiée après des expériences de mutagenèse dirigée chez le tabac (Vanlerberghe *et al.*, 1998) et sur l'AOX d'*Arabidopsis thaliana* exprimée chez *E. coli* (Rhoads *et al.*, 1998). Elle correspond donc à la plus N-terminale des 2 cystéines hautement (mais non universellement) conservées dans les séquences d'AOX de plantes (cf. chapitre 2).

Ces mêmes études ont également pu montrer que la cystéine responsable de la dimérisation de l'AOX était également la plus N-terminale, liant ainsi les 2 voies de régulation de l'AOX (fig 23) (Siedow & Umbach, 2000).

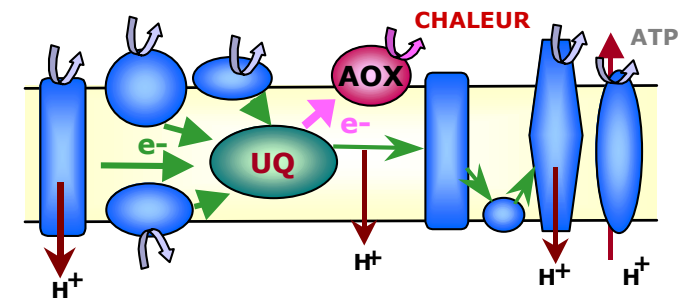
Des expériences de mutagenèse dirigée (Djajanegara *et al.*, 1999 ; Umbach *et al.*, 2002) ont suggéré un rôle qu'on pourrait qualifier d'indirect des acides α -cétoniques sur l'activation de l'AOX. Ainsi, des substitutions de la cystéine impliquée ici introduisant des charges positives produisent une AOX activée sans addition de pyruvate, alors que des substitutions n'introduisant pas de charges conduisent à une inactivation de l'enzyme. Ainsi, les acides α -cétoniques, en apportant une charge négative, provoqueraient un phénomène de répulsion électrostatique entre les 2 sous-unités, probablement à l'origine d'un changement de conformation activant la réaction enzymatique.

Malgré ces détails mécanistiques très précis, le point très incertain de ce schéma de régulation est le réel rôle physiologique de ce système *in vivo*. En effet, il semblerait que la concentration effective de pyruvate dans la matrice mitochondriale soit constamment très au-dessus des quantités requises pour obtenir l'activation maximale de l'AOX (Millenaar *et al.*, 1998), ce qui signifierait donc que l'AOX serait en permanence complètement activée par le pyruvate. D'autre part, il a été montré que l'AOX se retrouve essentiellement sous forme réduite *in vivo* (Millenaar *et al.*, 2001 ; Vanlerberghe *et al.*, 1999). Ceci signifie donc que l'enzyme est, dans l'immense majorité des situations, entièrement réceptive à une activation par un acide α -cétonique, et exclut donc une régulation directe par l'état redox des résidus de cystéine (Siedow & Umbach, 2000). Enfin, un récent modèle cinétique basé sur l'analyse de l'affinité de l'AOX pour l'oxygène a conclu sur le fait que la corrélation entre l'augmentation de l'affinité de l'AOX pour l'ubiquinone et la présence de pyruvate ne proviendrait pas d'une propriété intrinsèque de l'AOX, mais serait plutôt le résultat d'un contrôle métabolique géré de façon précise, efficace et globale par la mitochondrie (Affourtit *et al.*, 2001). Il est malgré tout notable que des mitochondries isolées "vidées" de tout pyruvate par l'action de la lactate déshydrogénase ne possèdent plus d'activité AOX détectable (Day *et al.*, 1994 ; Hoefnagel *et al.*, 1997 ; Umbach *et al.*, 2002). En résumé, le système exact de régulation de l'AOX dans la plante n'est donc pas encore élucidé et est matière à de nombreux débats et controverses, et il semble à présent nécessaire d'étudier ces différentes régulations *in vivo* afin de pouvoir conclure de façon plus certaine sur ce sujet.

4.5) Rôles de l'AOX

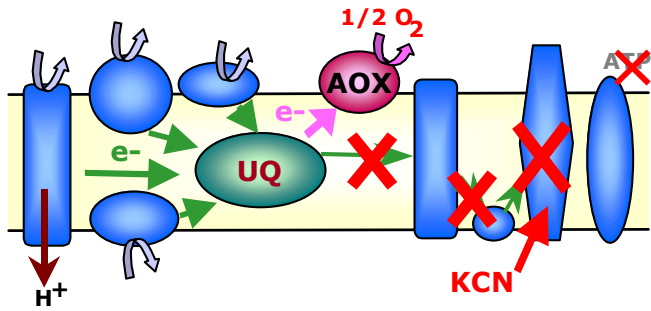
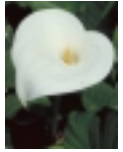
La description de la régulation assez complexe de l'AOX a permis d'entrevoir différents rôles pour cette enzyme. (fig 24)

Jusqu'à présent, son seul rôle absolument clairement identifié se situe dans le processus de thermogénèse des *Arum* (Skubatz *et al.*, 1991 in Vanlerberghe & McIntosh, 1997).



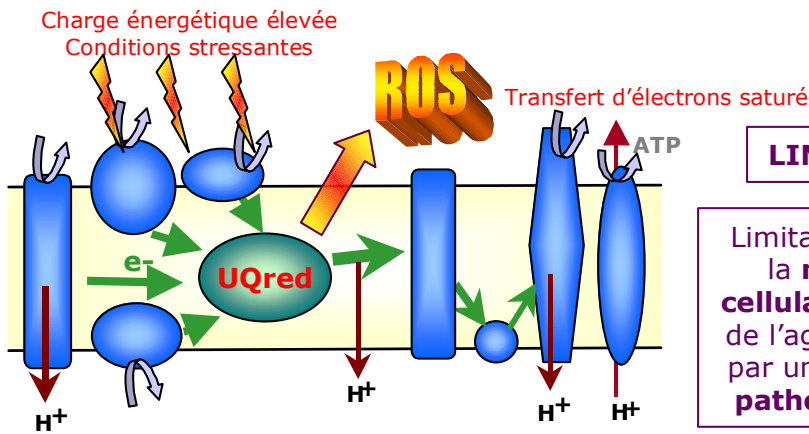
PRODUCTION DE CHALEUR

L'AOX permet la volatilisation de composés aromatiques et l'attraction des pollinisateurs chez les espèces thermogènes.



RESPIRATION EFFECTIVE

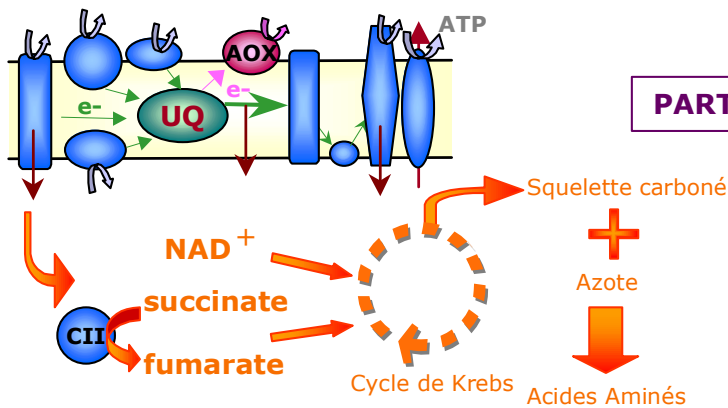
L'AOX permet à la respiration de continuer (avec une synthèse d'ATP limitée) malgré la production de KCN par la plante cyanogène, attaquée par un pathogène.



LIMITATION DE LA FORMATION DES ROS

Limitation de la **mort cellulaire** lors de l'agression par un **agent pathogène**.

L'AOX permet de maintenir un taux de réduction du pool d'ubiquinone bas, dans les conditions où la chaîne de transfert d'électrons est susceptible d'être saturée.



PARTICIPATION A L'ANABOLISME DE LA CELLULE

L'AOX empêche le blocage du cycle de Krebs lorsque la charge énergétique cellulaire est forte. Ce dernier peut donc continuer à fournir le squelette carboné des futurs acides aminés de façon continue.

Fig 24: Les différents rôles de l'AOX, confirmés ou supposés. L'apparent gaspillage d'énergie pour la mitochondrie a finalement de nombreuses fonctions, aussi bien au sein de phénomènes particuliers à certaines espèces, comme la thermogenèse et la production défensive de cyanure, que dans des situations de stress, très fréquentes au cours de la vie de la plante.

Chez ces espèces, le flux d'électrons dérouté de la voie des cytochromes vers l'AOX permet une production intense de chaleur, chaleur permettant de volatiliser certains composés aromatiques attractifs pour les insectes pollinisateurs (Meeuse, 1975 *in* Day et al, 1995).

Un autre rôle potentiel de l'AOX concerne la protection des plantes contre les attaques pathogènes, et ceci de plusieurs façons. D'une part, il existe approximativement 800 espèces de plantes capables de produire du cyanure lorsqu'on les blesse ou lorsqu'elles sont attaquées (Mansfield, 1983 *in* Vanlerberghe & McIntosh, 1997), et certains agents pathogènes ont d'ailleurs développé des voies respiratoires résistantes au cyanure (Rissler & Millar, 1977 *in* Vanlerberghe & McIntosh, 1997). L'AOX permettrait donc à ces plantes cyanogènes, de se défendre efficacement en protégeant leur propre anabolisme par une faible production d'ATP. D'autre part, et sans se limiter aux seules plantes cyanogènes, l'expression de l'AOX est induite dans le cadre de la réponse hypersensible, réaction de résistance de la plante aux attaques par des agents pathogènes, ceci sous la dépendance de la production d'acide salicylique et d'éthylène (Simons *et al.*, 1999). Il semblerait que l'AOX soit alors utilisée afin d'éviter la formation de ROS en bordure du site d'infection par l'agent pathogène, empêchant ainsi l'évolution des cellules vers un programme de mort cellulaire (Lam *et al.*, 1999), limitant ainsi l'étendue de la zone nécrosée. L'AOX serait donc capable de s'opposer au programme de mort cellulaire médié par la mitochondrie (Ordog *et al.*, 2002 ; Robson & Vanlerberghe, 2002, Vanlerberghe *et al.*, 2002).

La présence d'une "valve de sécurité" dans la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale peut avoir 2 avantages fondamentaux. D'une part, la mitochondrie étant une source importante de production de ROS, molécules se formant lorsque la chaîne de transfert d'électrons est saturée (Møller, 2001), l'AOX permettrait de limiter la formation de ces ROS en permettant de garder un niveau de réduction du pool d'ubiquinone assez bas (Yip & Vanlerberghe, 2001). Ainsi, il a été noté une augmentation de la production de ROS dans des plantes portant une construction antisens pour l'AOX, et *a contrario* une diminution de la production de ROS chez des tabacs surexprimant l'AOX (Maxwell *et al.*, 1999). De plus, à faible température, condition de culture stressante pour la plante, la répartition des électrons vers la voie de l'AOX augmente significativement (Ribas-Carbo *et al.*, 2000).

Le second intérêt majeur de l'AOX apparaît plus clairement lorsqu'on considère non plus le rôle catabolique de la mitochondrie, mais son action dans l'anabolisme de la cellule. En effet, les plantes sont autotrophes, et ont donc besoin de synthétiser elles-mêmes tous leurs acides aminés, à partir de l'assimilation de l'azote inorganique. Les squelettes carbonés nécessaires pour ce mécanisme sont dérivés des acides tricarboxyliques du cycle de Krebs. De ce fait, ce cycle a besoin de tourner de façon continue, et ceci indépendamment de la production d'énergie par la mitochondrie (Affourtit *et al.*, 2001 ; Vanlerberghe & McIntosh, 1997). L'AOX permettrait donc à ce processus d'avoir lieu même lorsque la charge énergétique de la cellule est élevée.

5) Objectif de ce travail

Le but recherché dans cette étude est multiple, et la caractérisation d'IMMUTANS a impliqué plusieurs étapes.

Dans un premier temps, et en se basant sur les connaissances de l'activité de l'AOX, nous avons cherché à répondre à la question suivante : IMMUTANS est-elle une quinol oxydase ? D'autre part, IMMUTANS est plastidiale (Carol *et al.*, 1999), mais sa localisation précise au sein de cette organelle n'était pas connue au début de notre étude. C'est pourquoi nous avons exprimé IMMUTANS dans un système procaryote afin de produire une protéine recombinante permettant d'obtenir des anticorps polyclonaux (chapitre 1), et nous avons également utilisé cette expression chez *Escherichia coli* pour mettre au point un test démontrant de façon claire l'activité enzymatique de quinol oxydase d'IMMUTANS (chapitre 2).

A ce stade de l'étude, après avoir montré qu'IMMUTANS était l'équivalent plastidial de l'AOX, nous l'avons rebaptisée "PTOX" pour "Plastid Terminal Oxydase" : afin de faciliter la lecture et la compréhension de ce rapport, c'est sous ce nom que sera désignée cette protéine à partir de maintenant, et le gène correspondant sera nommé *ptox*.

Dans une seconde partie, nous avons voulu comprendre la façon dont PTOX s'intègre dans les phénomènes que nous avons décrits dans cette introduction, à savoir la biosynthèse des caroténoïdes, les transferts alternatifs d'électrons tels que la chlororespiration, et la résistance au stress. Ce sera l'objet des chapitres 3 et 4 de cette étude, qui ont donc eu pour objectif d'intégrer PTOX dans la physiologie de la plante, afin d'établir sa réelle fonction *in vivo*.

MATÉRIELS & MÉTHODES

MATERIELS ET METHODES

I) Expériences en système bactérien

1) Souches et plasmides utilisés

1.1) Souches bactériennes

La souche *Escherichia coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^R)*]) (Stratagène) porte la mutation *lacI^q* ; elle surproduit le répresseur de l'opéron lactose, ce qui permet d'éviter une expression constitutive basale de la protéine recombinante, pouvant être toxique et empêcher une croissance bactérienne normale.

La souche *E. coli* SASX41B (*HfrPO2A hemaA1 metB1 relA1*) (Berthold, 1998) possède une mutation dans le gène codant pour la déhydrogénase du glutamyl-ARNt, impliquée dans la biosynthèse de l'acide aminolevulinique (Săsărman *et al.*, 1968 *in* Avissar & Beale, 1990). Cette souche est incapable de produire un hème fonctionnel, ce qui résulte en une absence de cytochromes oxydases bo et bd, et en conséquence une incapacité à se développer en conditions de respiration aérobie.

La souche *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 (*Ach5 pTiAch5*) (Hoekema *et al.*, 1983) a servi à l'infection de cotylédons de tomates afin de produire des plantes transgéniques (cf. partie III).

1.2) Plasmides

Le plasmide pbluescript KS +/- (Stratagène) a servi à toutes les étapes intermédiaires avant l'insertion des inserts soit dans un vecteur permettant la surexpression de la protéine, soit dans un vecteur binaire permettant la transformation des plantes par *A. tumefaciens*. Ce plasmide "high copy" apporte un gène de résistance à l'ampicilline, et il offre la possibilité de sélectionner facilement les clones portant l'insert grâce au clonage sous contrôle de l'opéron *lacZ*.

Le plasmide pQE 31 (QIAGEN) a permis la production de PTOX en système bactérien. Il apporte d'une part le gène de résistance à l'ampicilline, et d'autre part, après un ATG d'initiation, l'étiquette de 6 résidus d'histidine.

Le vecteur binaire pKYLX71::35S a été utilisé pour la construction ayant servi à transformer des plantes de tomate, transformation effectuée grâce à l'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens*. (cf. partie III).

Plusieurs clones produits au laboratoires ont également été utilisés dans cette étude, notamment PIM, portant l'ADNc de PTOX de poivron, et TIM, portant l'ADNc de PTOX de tomate.

2) Production de PTOX dans un système bactérien

2.1) Construction

Il a été réalisé une construction dans le but de surproduire la partie mature de PTOX d'*Arabidopsis thaliana* fusionnée à un peptide de marquage constitué de 6 résidus d'histidine, permettant par la suite une purification par affinité sur une matrice de nickel (système Qiagen)

Pour ce faire, un fragment de 1396 pb de l'ADNc de PTOX d'*A. thaliana* correspondant à la portion codant pour la protéine mature (du site de clivage du peptide de transit au codon stop) a été amplifié par PCR à l'aide des amorces :

5'-CGGATCCGCAACGATTTTGAAGACG côté 5',

5'-GCGCTGCAGTAACTTGTAAATGGATTCTTGAG côté 3',

amorces incluant pour l'une le site de restriction de Bam H1, pour l'autre le site de restriction d'Hind III.

Ce fragment a été inséré dans le vecteur pQE 31 (Qiagen), et cette construction nommée pQE IM 2+3 a alors servi à transformer la souche d'*Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagène)

Les clones utilisés pour la suite des études correspondent d'une part à un clone sélectionné portant l'insert décrit, et d'autre part à un clone "contrôle" possédant le vecteur commercial pQE 31 uniquement.

Simultanément, une construction (pQE IM 1+3) correspondant aux 130 acides aminés C-terminaux de PTOX d'*A.thaliana* a été produite selon la même stratégie et avec même amorce coté 3' et avec l'amorce : 5'-CGGATCCTCACTTTTCGGAATGTGTGG de l'autre coté. Ce clone a permis de produire la partie C-terminale de la protéine afin d'effectuer différents contrôles.

2.2) Essai de complémentation de la souche *E. coli* SASX41B

Le vecteur pQE IM 2+3 a également servi à transformer la souche *E. coli* SASX41B (aimablement fournie par D. Berthold) afin de la compléter. Ces bactéries sont cultivées sur du milieu minimum M9-Glycérol (Na₂HPO₄ 34mM, KH₂PO₄ 22mM, NH₄Cl 18mM, NaCl 8,5mM, MgSO₄ 1mM, CaCl₂ 0,1mM, Thiamine 1mM, Glycérol 0,2%, Agar 8g/l), additionné de 5-aminolevulinate (50µg/ml) pour permettre la formation d'hème, et d'ampicilline (100µg/ml) pour assurer la sélection du plasmide. La culture pour tester la possibilité de complémentation s'effectue elle en absence de 5-aminolevulinate.

2.3) Conditions de culture pour la surproduction de PTOX chez *E.coli* XL1-Blue

Après avoir testé différentes conditions de culture, il s'est avéré que les conditions suivantes permettaient une production optimale de PTOX.

Une culture est inoculée au 1/50° par une pré-culture en phase stationnaire du clone possédant PTOX. La culture est effectuée dans du milieu M9-glycérol (Na₂HPO₄ 34mM, KH₂PO₄ 22mM, NH₄Cl 18mM, NaCl 8,5mM, MgSO₄ 1mM, CaCl₂ 0,1mM, Thiamine 1mM,

Glycérol 0,2%), avec 10µg/ml de tétracycline et 100µg/ml d'ampicilline. La croissance bactérienne s'effectue sous agitation à 37°C, jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,4 environ. La production de la protéine recombinante est induite par addition d'IPTG (40µM final), et la poursuite de la culture s'effectue de façon différente selon l'utilisation prévue.

3) Purification de PTOX

Après induction de la production de PTOX dans la culture bactérienne par addition d'IPTG, la culture se poursuit pendant 6 h à 37°C, puis les bactéries sont récupérées par centrifugation sous la forme d'un culot.

3.1) Localisation de PTOX dans les fractions bactériennes (adapté de Sauge-Merle, 1998)

Afin d'effectuer la localisation de PTOX parmi les différentes fractions bactériennes, ceci permettant d'adapter le protocole de purification de la protéine recombinante, ces fractions ont été séparées et purifiées.

Le culot de bactéries est resuspendu dans 3 volumes de tampon d'extraction (NaCl 100mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 100mM, pH 7,6) et subit une série de congélations/décongélations dans l'azote liquide. La lyse des bactéries est achevée par un traitement aux ultrasons (6 fois 10 sec, 30W, 0°C), et la suspension est centrifugée pendant quelques secondes pour se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant est alors centrifugé pendant 35 min à 14000rpm et 4°C. Le surnageant obtenu correspond alors à la fraction des protéines solubles. Le culot est repris dans du tampon d'extraction additionné de 0,5% de Triton X-100 et agité pendant 30 minutes à 4°C. Après une centrifugation de 10 min à 14000rpm et 4°C, le surnageant correspond aux protéines faiblement liées à la membranes, et le culot est repris dans un second tampon d'extraction (DTT 1mM, Tris-HCl 50mM, pH 7,6) additionné d'urée 2M. La même opération que précédemment est effectuée, le surnageant récupéré correspondant aux protéines membranaires, tandis que le nouveau culot est resuspendu dans ce même tampon d'extraction additionné cette fois-ci d'urée 6M. Cette dernière étape permet de solubiliser les corps d'inclusions produits par la bactérie. Les échantillons extraits dans l'urée sont finalement dialysés contre plusieurs litres de tampon d'extraction.

3.2) Purification en conditions dénaturantes

Le culot de bactéries est resuspendu dans un tampon de lyse (urée 6M, Imidazole 20mM, Triton X-100 0,1%, Tris 10mM, pH 7,5), à raison de 5ml par gramme de cellules. L'échantillon est alors traité aux ultrasons (3 fois 30 sec, 30 W, 0°C), puis incubé sous agitation pendant 1 heure à 4°C. Une centrifugation de 1 min à 14000rpm et à 4°C permet d'éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant est alors ajouté à 250µl de résine Ni-NTA Agarose (Qiagen) pré-équilibrée dans du tampon de lyse, et laissé sous agitation pendant au moins 1 heure à 4°C.

Une centrifugation de 30 secondes à 6000 rpm permet de sédimenter la résine. Le surnageant, qui correspond à la fraction qui n'a pas été retenue par le nickel, est ajouté à 250µl de Ni-NTA Agarose, et incubé sous agitation pendant au moins 1 heure à 4°C puis centrifugé dans les mêmes conditions. Ceci permet de récupérer une assez grande quantité de protéine qui n'aurait pas été retenue sur la résine lors de la première incubation.

Les 2 résines sont alors lavées successivement par 4 fois 1ml de tampon de lyse, puis par 2 fois 1 ml de tampon de lyse contenant 60mM d'imidazole. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation de 20 sec à 1000rpm. Deux éluions successives sont pratiquées grâce à l'addition de 300µl d'un tampon d'éluion (urée 6M, imidazole 450mM, Tris 10mM, pH 7,5), suivie d'une incubation dans la glace pendant 15 min, en agitant plusieurs fois, et d'une centrifugation de 30 secondes à 6000rpm. On obtient ainsi des surnageants contenant la protéine purifiée.

La qualité de la purification ainsi que la quantité de protéine surproduite sont estimées par une électrophorèse sur minigel de polyacrylamide 12,5% en conditions dénaturantes, suivie d'une coloration du gel au bleu de Coomassie (Sambrook *et al.*, 1989, pp.18.47 à 18.55).

3.2) Purification en conditions non dénaturantes

Pour purifier la protéine recombinante en conditions non dénaturantes, la culture s'effectue à 25°C, afin d'éviter la formation de corps d'inclusion. Le principe et la méthode de purification ne changent pas, mais les tampons utilisés pour conserver la protéine dans une structure native sont différents :

- .. tampon de lyse: NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazole 20mM, pH 8,1
- .. tampon de lavage: NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazole 60mM, pH 8,1
- .. tampon d'éluion: NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazole 450mM, pH 8,1.

4) Préparation de membranes bactériennes (adapté de Labouré, 1986)

Après induction de la production de PTOX dans la culture bactérienne par addition d'IPTG, la culture se poursuit pendant 3 heures à une température comprise entre 25°C et 30°C, afin de limiter la formation de corps d'inclusion par les bactéries, et sous agitation forte, pour permettre une oxygénation optimale de la culture, dans le but d'éviter la production de cytochrome bd, connu pour résister à des concentrations relativement élevées de KCN.

Les bactéries en phase exponentielle sont alors collectées et lavées par une centrifugation de 10 minutes à 4000rpm et à 4°C (JOUAN CR412) dans le tampon TMS (MgCl₂ 10mM, saccharose 0,75M, Tris-HCl 20mM pH7,5). Le culot obtenu est repris dans le tampon TS (saccharose 0,75M, Tris-HCl 0.2M pH7,5) à raison de 5 ml par gramme de bactéries. Du lysozyme 200µg/ml et de l'EDTA 25mM sont ajoutés, et le mélange est incubé à 30°C pendant 30 min, avant d'être soumis à un choc osmotique par addition de 2 volumes d'eau, suivi d'un traitement aux ultrasons (3 fois 30 sec, 30W, 0°C). Une

centrifugation de 7 min à 4000rpm et à 4°C permet d'éliminer les gros débris cellulaires et les bactéries non lysées. Une centrifugation de 1 heure à 40000rpm et à 4°C (BECKMAN L8-55, rotor 50Ti) donne un culot qui, remis en suspension dans du tampon TS, constitue les membranes bactériennes.

La quantité de protéines présente dans ces extraits est dosée grâce au réactif de Bradford (Biorad protein assay) en présence de Triton X-100 0,01%.

5) Immunodétection de PTOX

5.1) Préparation d'extraits bactériens

Les différents extraits, qu'ils soient "bruts" ou qu'ils correspondent à des étapes de purification sont repris dans du tampon de dépôt pour SDS-PAGE 4X (glycérol 10%, SDS 3%, bleu de bromophénol 0,05%, Tris-HCl 62,5mM pH 6,8) ou, dans le cas d'une séparation sur gel natif, dans du TBS (NaCl 50mM, Tris-HCl 20mM pH 7,4) additionné de glucose (une petite spatulée) et de bleu de bromophénol 0,05%.

5.2) Sonde

L'anticorps utilisé pour détecter PTOX est un anticorps polyclonal dirigé contre la totalité de la protéine mature d'*Arabidopsis thaliana*. Il a été obtenu après sacrifice de 2 lapins immunisés par 1mg de PTOX purifiée dans un premier temps comme décrit précédemment, et dans un deuxième temps par SDS-PAGE 12,5%. Le fragment d'acrylamide contenant PTOX a été broyé et lyophilisé et a servi à l'injection. La précipitation du sérum des 2 lapins par l'acide caprylique (Harlow *et al*, 1988, p.300) a permis de récupérer une solution débarrassée des protéines sériques des lapins, et de qualité suffisante pour obtenir une détection propre de PTOX dans la plupart des échantillons testés.

Alternativement, nous avons également utilisé un anticorps dirigé contre l'étiquette d'histidine porté par la protéine recombinante (anti-his tag, Biorad), anticorps permettant d'obtenir des signaux de détection souvent plus propres.

5.3) Western-blot

La présence de PTOX dans les différents extraits protéiques a été testée par western blot soit après une électrophorèse en condition dénaturantes (SDS-PAGE, Sambrook *et al*. pp 18.47 à 18.54), soit après une électrophorèse en conditions natives (Native-PAGE), les protéines étant ensuite transférées en utilisant une technique de transfert humide sur membrane PVDF (Sambrook *et al.*, 1989, pp. 18.60 à 18.73). L'anticorps secondaire utilisé est couplé à la peroxydase du Raifort (HRP), et la révélation s'effectue soit par une réaction colorée grâce au kit "HRP Conjugate Substrate" (Biorad), soit grâce au système "ECL western blotting" (Amersham Pharmacia BioTech) permettant une détection plus sensible par une méthode chémoluminescente. La détection du signal est effectuée selon les indications du fabricant.

6) Mesures d'oxygraphie

L'activité oxydase de PTOX est mesurée grâce à une électrode de Clark (HANSATECH), sous contrôle du logiciel OXYLAB 1.10 (HANSATECH). Ce système permet de mesurer la concentration d'O₂ dissous dans la chambre de mesure à chaque instant : on peut ainsi suivre la production ou la consommation d'O₂ par les échantillons incubés dans cette chambre.

Le signal délivré par l'électrode de Clark varie linéairement entre une valeur minimale (0% d'O₂) et une valeur maximale (100% d'O₂). Ces valeurs sont fonctions de la température à laquelle s'effectue la mesure. La majorité de nos expériences ont été faites à 25°C, ce qui correspond à un maximum de 240nmoles d'O₂ dissous dans 1ml d'eau. Le calibrage de l'électrode est nécessaire afin d'obtenir une correspondance entre les variations du signal fourni par l'électrode et la quantité d'O₂ dissout. Le 100% correspond à la quantité d'oxygène dissous dans 1 ml d'eau, alors que le 0% est obtenu après saturation du milieu avec de l'azote gazeux.

Afin de calibrer les essais, les mesures sont effectuées sur une quantité de membranes correspondant à 100µg de protéines et dans un milieu d'électrode: KCl 10mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 1mM, additionnés d'un tampon différent selon les pH désirés (KH₂PO₄ 50mM: pH 5,5 à 8, Tris-Maléate 50mM: pH 6 à 8, Glycine-NaOH 50mM: pH 8,5 à 9).

Les valeurs des activités de consommation d'oxygène sont calculées grâce au logiciel OXYLAB, et correspondent aux pentes des tracés enregistrés. Les consommations d'O₂ sont données en nmol d'O₂ consommé par minute et par mg de protéines.

D'une façon générale, les différents réactifs couramment utilisés sont ajoutés aux concentrations suivantes : NADH : 1mM ; quinones : 0,2mM ; KCN : 2mM ; nPG : 0,5mM. Les concentrations des autres réactifs utilisés selon les besoins des expériences sont indiquées dans les résultats (cf. chapitre 2).

Il est important de signaler ici qu'à chaque expérience de purification de membranes, l'état physiologiques et l'intégrité des protéines impliquées dans la chaîne de transport d'électrons de la respiration bactérienne peut varier. De ce fait, les activités respiratoires enregistrées par oxygraphie diffèrent d'une préparation à l'autre, ce qui rend difficile l'obtention de moyennes à partir de plusieurs expériences indépendantes. Aussi, la plupart des résultats présentés correspondent à une expérience représentative de la tendance dégagée parmi plusieurs réplicats.

Lorsque l'interprétation des résultats le nécessite, les valeurs de consommation d'oxygène correspondant à l'activité PTOX sont rapportées aux valeurs de consommation d'oxygène de la membrane bactérienne en l'absence de tout inhibiteur, correspondant au 100% de consommation d'O₂ (cf. chapitre 2).

II) Expériences sur matériel végétal

1) Plantes utilisées

1.1) Plantes modèles (fig 25)



Lycopersicon esculentum
Micro-Tom



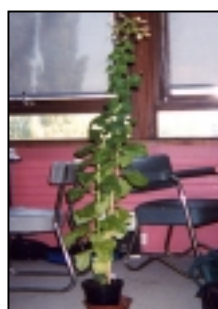
Ailsa Craig



Capsicum
annuum



Arabidopsis
thaliana



Nicotiana
tabacum

Fig 25: *Plantes modèles utilisées dans cette étude*

Arabidopsis thaliana, l'Arabette de Thalie, plante modèle des laboratoires par excellence. Le mutant à l'origine de la découverte de PTOX est un mutant *immutans* d'*Arabidopsis thaliana* (cf. introduction, §3).

Lycopersicon esculentum, la tomate, est un modèle très couramment utilisé lorsqu'on étudie des phénomènes liés à la biosynthèse des caroténoïdes. Au laboratoire, nous utilisons l'écotype *Alsa craig* ainsi que le cultivar Micro-Tom (cf. partie III, §3).

Capsicum annum, le poivron, est également un modèle très utilisé lorsqu'on s'intéresse à la maturation des fruits. Il a le désavantage de ne pas être transformable à l'heure actuelle, mais il est possible de purifier des chromoplastes intacts à partir de ses fruits.

Nicotiana tabacum, var. *petit havana*, le tabac, chez lequel la transformation plastidiale est possible, et pour lequel des plants PTOX+ ont été produits par Thierry Joët (laboratoire d'écophysiologie de la photosynthèse du CEA de Cadarache).

1.2) Plantes d'altitude et de plaine (fig 26)

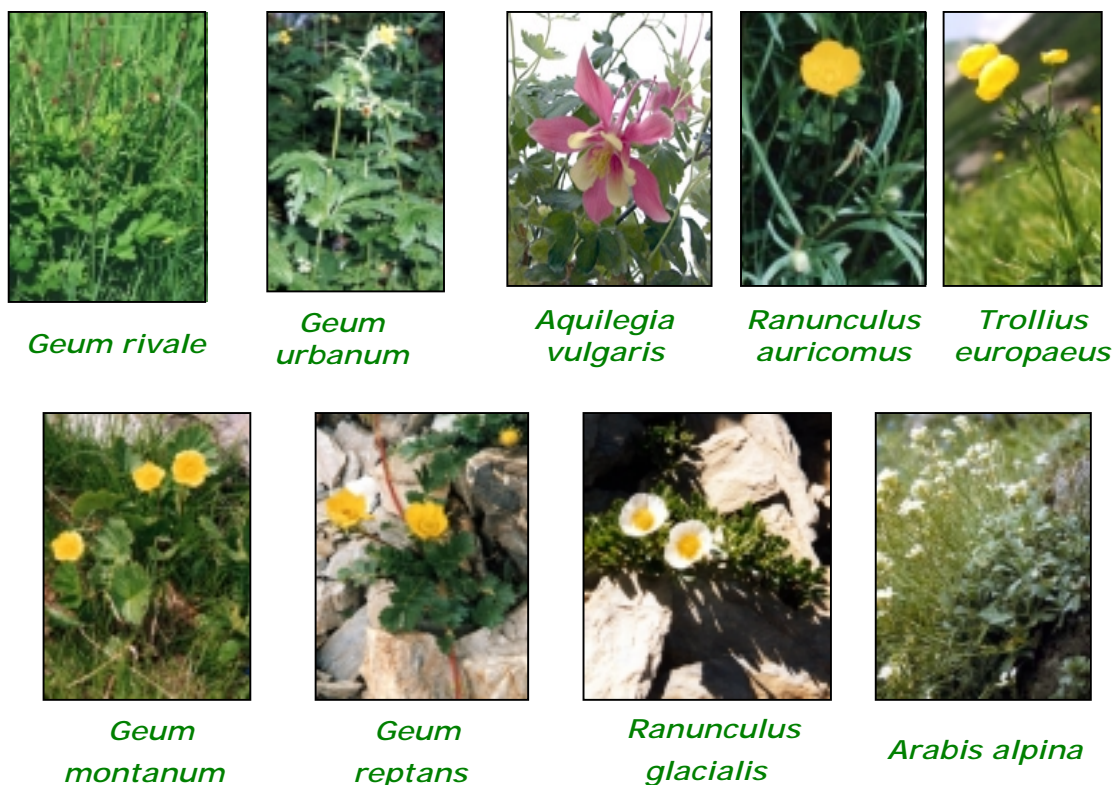


Fig 26: *Plantes de plaine et d'altitude utilisées dans cette étude*

3 espèces de benoîtes (rosacées) poussant à des altitudes variables ont été comparées: *Geum reptans* L., la benoîte rampante, est une plante des éboulis silicieux humides, trouvée dans les Hautes-Alpes entre 2200 et 2800 m. Elle a été principalement récoltée au col du Galibier (2600m) (Hautes-Alpes)

Geum montanum L., la benoîte des montagnes, hôte des prairies alpines, des sols silicieux et riches en humus est principalement récoltée entre le col du Lautaret (2100m), et le col du Galibier (2600m)

Geum urbanum L., la benoîte commune, plante des sous-bois et de basse altitude, vivant entre 200 et 1500m, a été ramassée dans la vallée de Briançon (Hautes-Alpes).

Une autre espèce de benoîte a permis d'effectuer des expériences préliminaires :

Geum rivale L., la benoîte des ruisseaux, est une plante de basse altitude, ramassée dans la plaine grenobloise (Isère).

2 autres espèces de haute altitude (une renonculacée et une brassicacée) ont permis de compléter cette étude :

Ranunculus glacialis L., la renoncule des glaciers, récoltée au col du Galibier (2600m)

Arabis alpina L., l'arabette des Alpes ou corbeille-d'argent, ramassée au-dessus du col du Galibier, vers 2800m.

Enfin, 3 espèces de renonculacées de plaine ou de plus basse altitude ont été utilisées comme témoin :

Aquilegia vulgaris L., l'ancolie vulgaire, achetée chez un pépiniériste grenoblois, et ayant poussé en plaine.

Ranunculus auricomus L., le renoncule à tête d'or, ramassée en plaine sur le campus de Saint Martin d'Hères.

Trollius europeus L., le trolle d'Europe, plante de moyenne altitude, ramassée à environ 1700m d'altitude au col du Pré (Savoie).

2) Analyses d'expressions

2.1) Au niveau transcriptionnel

2.1.1) Extraction d'ARN

.. de feuilles de plantes modèles

Après avoir au préalable chauffé à 65°C un tube Falcon contenant 1,5ml de Phénol et 1,5ml de tampon d'extraction (Tris 100mM pH 8, EDTA 10mM, LiCl 100mM, SDS 1%), les feuilles (environ 3g) sont broyées en fine poudre dans un mortier en présence d'azote liquide. La poudre est alors ajoutée au mélange pré-chauffé ; il est important d'homogénéiser immédiatement (le matériel doit se décongeler au contact du phénol chaud). Les tubes sont alors centrifugés à 3600rpm pendant 10min (JOUAN CR412), et, si la phase phénolique semble saturée, la phase aqueuse supérieure est récupérée et re-extraite au phénol. La phase phénolique quant à elle est ré-extraite avec 2,5ml de tampon d'extraction et les tubes sont de nouveau centrifugés à 3600rpm pendant 10min. Les phases aqueuses sont alors rassemblées et 1 volume de chloroforme est ajouté. Après mélange vigoureux et centrifugation pendant 3min à 3600rpm, la phase aqueuse peut à nouveau être extraite au chloroforme si la phase organique semble saturée.

La phase aqueuse est par la suite transférée dans un tube Corex et l'ARN est précipité par addition de 0,5 volume de LiCl 6M. Après mélange par inversion, l'ensemble est laissé pendant une nuit à 4°C. Une centrifugation à 9000rpm et 4°C pendant 30min (BECKMAN J-21, rotor JA20) permet de récupérer un culot ARN qui est lavé à l'éthanol 70%, transféré dans un tube eppendorf, rincé à l'éthanol 100%, puis séché.

L'ARN est alors traité à la protéinase K afin de détruire toute protéine contaminante de type ARNase qui pourrait subsister dans la solution. Il est dissout dans 50 à 150µl d'un tampon (SDS 0,4%, Tris 10mM pH 8, eau traitée au DEPC) contenant 40µg/µl de protéinase K (Bioprobe), et incubé pendant 1h à 50°C, puis une autre heure à température ambiante. Un volume de phénol est alors ajouté, et, après le mélange, on procède à une incubation à température ambiante pendant 5min, puis à 57°C pendant 10 min, puis de nouveau à température ambiante pendant 5min. Une centrifugation à 14000rpm pendant 5min permet de récupérer la phase aqueuse, à laquelle on ajoute un volume de chloroforme. Un nouveau mélange et une nouvelle centrifugation permettent d'obtenir une phase aqueuse contenant l'ARN propre. Celui-ci est précipité en ajoutant à la phase aqueuse 1/10 de volume de d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 (préparé dans de l'eau traitée au DEPC) et 2 volumes d'éthanol 100%, et le mélange est laissé pendant la nuit à -20°C.

L'échantillon est centrifugé à 14000rpm et à 4°C pendant 20min, puis dissous dans 20 à 200µl d'eau traitée au DEPC. La qualité et la quantité d'ARN sont mesurés d'une part par la mesure de la DO_{260} , et d'autre par grâce à une électrophorèse sur gel dénaturant.

La concentration et la pureté des ARN sont estimées, par spectrophotométrie (spectrophotomètre Hitachi), par la mesure de l'absorbance à 260nm. 2µl du stock est mélangé à 500µl de tampon TE (Tris 10mM, pH 7,5, EDTA 1mM). Une unité de DO_{260} correspond approximativement à une concentration en ARN de 40µg/ml

La quantité et la qualité des ARN sont vérifiées par électrophorèse sur gel dénaturant. Cette technique permet de séparer les ARN en fonction de leur taille et d'estimer la quantité et leur degré de pureté. 500ng d'ARN totaux (quantité estimée par la spectrophotométrie) sont ajoutés à 10µl tampon de charge (tampon MOPS 1X (MOPS 20mM, acétate de sodium 5mM, EDTA 1mM), formaldéhyde 2,1M, formamide désionisée 10mM, BET 0,5µg/ml, bleu de bromophénol 0,05%) et incubés à 60°C pendant 2 min. Avant le dépôt, le gel est mis en pré-migration tandis que les ARN sont dissous dans du tampon de charge. Après stockage dans la glace pendant 5 min, les échantillons sont déposés sur gel d'agarose dénaturant en présence de formaldéhyde (agarose 1,2%, tampon MOPS 1X, formaldéhyde 2,1M). La migration s'effectue dans le tampon MOPS 1X pH 6-7 pendant 3-4 heures sous une tension de 76V. Après la migration, la fluorescence du complexe acides nucléiques-BET est observée sous lumière UV.

.. de feuilles de plantes alpines

Après broyage des tissus dans de l'azote liquide, la poudre est resuspendue dans un tampon d'extraction (guanidine-HCl 8M, MES 20mM, EDTA 20mM, β-mercaptoéthanol 50mM, dithionite de sodium 20mM, pH 7,0), à raison de 3ml par gramme de tissu foliaire, et la suspension est laissée à incuber pendant 10min à température ambiante. On ajoute alors 0,5 volume de phénol et 0,5 volume de chloroforme ; l'ensemble est vortexé puis centrifugé pendant 10min à 14000rpm (Eppendorf 5417R) et à 4°C afin de séparer les 2 phases.

La phase aqueuse est récupérée et la phase organique ré-extraite en ajoutant de 2 à 5ml de tampon d'extraction. Les phases aqueuses sont rassemblées, et on répète une nouvelle fois l'extraction au phénol/chloroforme. On ajoute alors à la phase aqueuse 0,2 volume d'acide acétique 1M et 0,7 volume d'éthanol 100%. L'ensemble est mélangé et laissé à précipiter pendant la nuit à -20°C.

Une centrifugation à 14000rpm pendant 15 min et à 4°C est suivie de 2 lavages à l'éthanol 70%, puis d'un lavage à l'éthanol 100%, et le culot d'ARN est séché. Il est ensuite repris dans le tampon de traitement à la protéinase K et la suite des opérations s'effectue comme décrit précédemment .

2.1.2) RT-PCR

La transcription inverse (RT) permet la synthèse de molécules d'ADN complémentaires (ADNc) simple brin à partir d'une matrice d'ARN. Elle est effectuée grâce à la Transcriptase Reverse du virus de la Leucémie Murine de Moloney (M-MLV Reverse

Transcriptase (GibcoBRL)), à partir d'une quantité fixée d'ARN totaux et d'une amorce oligo-dT capable de s'apparier à la séquence polyA retrouvée en 3' des ARN. L'ARNm de la globine de lapin (GibcoBRL) est ajouté comme contrôle pour vérifier le bon déroulement de la réaction.

Le mélange réactionnel est composé du tampon de la Transcriptase Reverse (Tris-HCl 50mM pH 8,3, KCl 75mM) de MgCl₂ 2,5mM, de DTT 10mM, de dNTP 1mM, d'oligo-dT 0,5µM, d'inhibiteur d'ARNase 1u/µl (RNaseOUT Recombinant Ribonucléase Inhibiteur (GibcoBRL)), d'ARNm de globine de lapin 0.1pg/µl et de Transcriptase Reverse 5u/µl, le tout dans un volume de 20µl.

Le mélange réactionnel est alors incubé à 20°C pendant 10min, puis 35min à 37°C et enfin 15min à 42°C. Les ADNc obtenus peuvent ensuite servir de matrice pour les réactions de PCR.

La PCR permet l'amplification en grande quantité de fragments d'ADN situés entre deux séquences connues grâce à l'utilisation de polymérases capables de synthétiser l'ADN à des températures élevées (68°C pour l'Elongase[®] enzyme mix (GibcoBRL)).

Afin d'éviter une dégradation des amorces utilisées suite à l'action (parasite) exonucléase de l'Elongase[®], on effectue 2 mélanges réactionnels séparés qu'on additionne au dernier moment. Le premier contient les dNTP (1mM), les 2 amorces spécifiques (8ng/µl), et entre 1 et 5µl de la réaction de RT. Le second est composé d'un mélange des 2 tampons fournis par le fabricant, et de l'Elongase[®] (0,5u). Le volume réactionnel total est de 25µl. L'amplification consiste en une étape de dénaturation de 45sec à 94°C suivie de 30 à 35 cycles de dénaturation (45sec à 94°C), hybridation (1min à une température comprise entre 45 et 55°C), élongation (2min à 68°C). Enfin, la réaction se termine par une dernière étape d'élongation de 10min à 68°C.

10 µl de la réaction servent alors à séparer par électrophorèse sur gel d'agarose 2% les fragments d'ADNc amplifiés.

2.1.3) Séquençage des produits PCR

20µl de la réaction de PCR sont purifiés grâce au kit QIAquick PCR purification kit (QIAGEN), et environ la moitié (1µg) est utilisée pour déterminer la séquence du fragment, grâce à l'utilisation des amorces ayant servi à la PCR, utilisés à une concentration d'1,5µM.

Les réactions d'incorporation des ddNTP s'effectuent grâce à un thermocycleur PTC-100™ (MJ Research, Inc.) et l'analyse des séquences est effectuée par un séquenceur ABI (Applied Biosystems, 373 DNA Sequencer, STRETCH).

2.2) Au niveau traductionnel

2.2.1) Purification de chloroplastes

Le protocole est donné pour 100g de matière fraîche, les différentes étapes s'effectuent soit en chambre froide soit dans la glace.

Les feuilles sont lavées, essorées puis broyées dans 500ml de tampon GR (Sorbitol 330mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 1mM, EDTA 2mM, MgCl_2 1mM, MnCl_2 1mM, HEPES/NaOH 50mM, pH 6,8) additionné de DTT 1mM pendant 2 à 3 secondes dans un mixer (Waring Blendor). Le broyat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze et une toile à bluter de 50 μm de vide de maille. Puis la suspension est centrifugée à 4500rpm et à 4°C pendant 10min (BECKMAN J-21, rotor JA20).

Les différents gradients sont préparés à partir d'une solution de percoll PCBF (pour 100ml de percoll: 3g de PEG 600, 1g de ficoll et 1g de BSA). 7ml de percoll 80% (20ml GR5X, 80ml PCBF) sont ajoutés doucement à l'aide d'une pipette pasteur à travers 21ml percoll 40% (20ml GR 5X, 40ml H₂O, 40ml PCBF)

Les culots de chloroplastes obtenus après centrifugation sont repris délicatement à l'aide d'un pinceau dans un volume minimal de tampon GR, puis déposés sur les gradients de percoll, et centrifugés à 4000rpm et à 4°C pendant 20min (JOUAN CR412). Les chloroplastes intacts se retrouvent à l'interface percoll 40%/80%, les chloroplastes cassés au-dessus de la couche à 40%. Les chloroplastes intacts sont repris par 2 volumes de tampon GR additionné de DTT 1mM et centrifugés pendant 10min à 4000rpm et à 4°C (JOUAN CR412).

Ils sont ensuite, après éclatement par une série de congélations/décongélations dans l'azote liquide, traités par un des protocoles d'extraction des protéines.

2.2.2) Purification de chromoplastes de poivron

.. Isolement de chromoplastes intacts

Le matériel (1 fruit) est broyé dans un Waring Blendor pendant 3 fois 1 secondes en présence de tampon C (Tris 50mM, Sorbitol 330mM, EDTA 1mM, pH 7,6). Le broyat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze et une toile à bluter de 50 μm de vide de maille, puis centrifugé pendant 1 min à 1000rpm et 4°C. Le culot est lavé par reprise dans quelques ml de tampon C et à centrifugé pendant 5 min à 4000rpm et 4°C. Le culot est alors resuspendu dans le plus petit volume de tampon C et déposé sur un gradient de saccharose. Pour un petit fruit, 2 gradients sont nécessaires et sont constitués de 3 couches de 10 ml de densités différentes grâce à des concentrations en saccharose différentes : 0,2M, 0,84M et 1,45M. Les différentes solutions de saccharose sont préparées dans un tampon : Tris 50mM pH 7,6, EDTA 1mM, β -mercaptoethanol 0,007‰.

Les gradients sont mis à centrifuger pendant 45min à 4°C et 62000g (18500 rpm sur le rotor JS-24.38, centrifugeuse Avanti J-30). On obtient ainsi 2 bandes : la plus haute correspond aux chromoplastes cassés, la plus basse aux chromoplastes intacts. Ces derniers sont recueillis et dilués dans du Tris-HCl 50mM pH 7,6 additionné de β -mercaptoethanol 0,007‰ (Tris/ β me), à raison de 1ml pour 1,5ml de suspension, puis centrifugés pour être concentrés à 4000rpm pendant 5 min.

.. Sous-fractionnement

Les chromoplastes sont lysés dans quelques un volume faible de Tris/ β me par homogénéisation prolongée dans un Potter, ceci pendant 10 min et au froid.

Ils sont ensuite déposés sur un nouveau gradient de saccharose (2 gradients pour 1 fruit) constitué de 5 couches différentes : 4ml d'une solution de saccharose 0,5M (préparée dans le tampon précédemment décrit), 1,5 ml à 0,56M, 1,5ml à 0,63M, 1,5ml à 0,70M, et enfin 2ml à 0,84M, et les gradients sont mis à centrifuger pendant 1 heure à 75000g (25000rpm sur le rotor SW40, centrifugeuse L8, Beckman).

La bande flottant au-dessus de ce gradient est récupérée et diluée dans Tris/ β me, et l'échantillon est centrifugé à 100000g pendant 4 heures (28000rpm sur le rotor SW40, centrifugeuse L8, Beckman). Le culot obtenu correspond à la fraction insoluble légère.

La bande recueillie à l'interface 0,5M/0,56M correspond aux fibrilles, et la bande recueillie à l'interface 0,70M/0,84M correspond aux membranes. Elles sont toutes les 2 diluées dans 1 volume de Tris/ β me et déposées chacune sur un nouveau gradient composés de 3 couches différentes : 10ml d'une solution de saccharose à 0,5M, 10ml à 0,56M et 5ml à 0,63M. Les échantillons sont alors centrifugés pendant 1h à 75000g (20000rpm sur le rotor JS-24.38, centrifugeuse Avanti J-30). La bande à l'interface 0,5M/0,56M correspond aux fibrilles, et le culot aux membranes. Les 2 sont recueillis et dilués avec du Tris/ β me, puis centrifugés pendant 10 min à 4000rpm et 4°C.

.. Séparation du stroma et des fraction insolubles

Le lysat obtenu suite à l'éclatement des chloroplastes avec le Potter est centrifugé pendant 4h à 100000g (28000rpm sur le rotor SW40, centrifugeuse L8, Beckman) et à 4°C. Le surnageant obtenu correspond à la fraction soluble. Le culot est lui lavé dans du Tris/ β me et centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot obtenu constitue alors la fraction insoluble totale.

2.2.3) Préparation de protéines totales (adapté de Hurkman & Tanaka, 1986)

Les échantillons (250 à 300mg) sont congelés dans l'azote liquide, pulvérisés par broyage dans un mortier (s'il s'agit de morceaux de feuilles ou de fruits), puis extraits dans 600 μ l de tampon de Tanaka (saccharose 0,7M, Tris 0,5M pH 8, EDTA 5mM, NaCl 100mM, PMSF 2mM, β -mercaptoéthanol 2%). Un volume de phénol est ajouté et l'échantillon est agité pendant 20min à température ambiante. Après centrifugation (14000rpm, 5 min, 4°C), la phase phénolique contenant les protéines est récupérée et les protéines sont précipitées par addition de 5 volumes d'acétate d'ammonium 100mM/méthanol pendant une nuit à -20°C. Suite à une centrifugation (14000rpm, 10 min, 4°C), le culot est rincé 2 fois dans l'acétate d'ammonium 100mM/méthanol, puis dans l'acétone 100%.

Les culots sont séchés pendant 5 à 15 minutes (en fonction de la taille du culot) puis solubilisés dans du tampon de dépôt pour SDS-PAGE (glycérol 2,5%, SDS 0,75%, Tris-HCl 15mM pH 6,8).

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) en utilisant le système "DC protein assay" de Biorad. Une gamme standard est réalisée à l'aide d'une solution de Sérum Albumine Bovine (BioRad). L'absorbance est mesurée à 750nm (Spectrophotomètre Hitachi).

2.2.3) Préparation de protéines insolubles (adapté de Joët, 2001)

Le matériel végétal (une quantité correspondant à 2 disques foliaires environ) est broyé dans l'azote liquide en fine poudre, resuspendue dans environ 5ml de tampon 1 (Tris-HCl 50mM pH 8, β -mercaptoéthanol 50mM, PMSF 1mM) et agitée pendant 30min à 4°C. Après une centrifugation de 20min à 19000rpm et 4°C (BECKMAN J-21, rotor JA20), le surnageant obtenu correspond aux protéines solubles.

Le culot est repris dans un volume adéquat de tampon 2 (Tris-HCl 50mM pH 8, β -mercaptoéthanol 50mM, PMSF 1mM, NaCl 150mM), agité pendant 30min à 4°C, puis l'échantillon est à nouveau centrifugé pendant 20min à 19000rpm et 4°C. Le surnageant contient alors les protéines extrinsèques liées aux membranes biologiques.

Le culot est repris dans un volume correct de tampon 3 (Tris-HCl 50mM pH 8, β -mercaptoéthanol 50mM, PMSF 1mM, SDS 1%), agité pendant 30min à 4°C, puis l'échantillon est à nouveau centrifugé pendant 20min à 19000rpm et 4°C. Le surnageant contient alors les protéines insolubles et membranaires.

Des aliquotes de 100 et 300 μ l sont prélevées pour le dosage des protéines (cf. § 3.2.2), et le reste des échantillons est précipité par addition de 4 volumes d'Acétone 100% pendant une nuit à -20°C.

Les échantillons sont alors repris dans du tampon de dépôt pour SDS-PAGE à une concentration de 5mg/ml.

2.2.4) Western-blot

Les analyses par western-blot sont effectuées comme décrit précédemment (partie I, §5.3) et la révélation s'effectue grâce au système "ECL western blotting" (Amersham Pharmacia BioTech). La détection du signal est effectuée selon les indications du fabricant.

L'anticorps anti-PTOX que nous avons produit est couramment utilisé au 1/15000^{ème}. L'anticorps polyclonal anti-NdhH, aimablement fourni par Dominique Rumeau et Gilles Peltier (laboratoire d'écophysiologie de la photosynthèse, CEA de Cadarache) est utilisé au 1/1000^{ème}. L'anticorps monoclonal anti-IE31, aimablement fourni par Maryse Block (laboratoire de physiologie cellulaire végétale, CEA de Grenoble), est utilisé au 1/150000^{ème}. Enfin l'anticorps monoclonal anti-his (Amersham) est utilisé au 1/3000^{ème}.

Les fractions purifiées de stroma, d'enveloppe et de thylacoïdes d'*Arabidopsis thaliana* nous ont été aimablement fournies par Solène Kowalski et Norbert Rolland (laboratoire de physiologie cellulaire végétale, CEA de Grenoble).

3) Traitements stressants des benoîtes

Des feuilles des trois espèces de benoîtes ramassées la veille au soir sont exposées à un stress lumineux d'environ 2000 μ mol/m²/s (intensité lumineuse couramment mesurée en montagne), soit à une température de 0°C (sur la glace), soit à une température d'environ 15°C (feuilles flottant à la surface de l'eau) (phase de stress). Elles sont

ensuite laissées à l'obscurité pendant plusieurs heures (phase de récupération), une nouvelle fois dans les 2 combinaisons de températures possibles (15°C ou 0°C).

Les feuilles ainsi traitées sont alors utilisées soit pour une mesure de photoinhibition (§4), soit pour une analyse de protéines (§ 2.2.3), soit pour une analyse de pigments (§5).

4) Mesure de la photoinhibition

La mesure du rendement quantique optimal du PSII permet de refléter l'état de photoinhibition des plantes ayant subi différents traitements. Elle est mesurée grâce à un Mini-Pam (Walz, Allemagne), permettant d'émettre des flashes de lumière saturants et de mesurer la fluorescence émise par les pigments chlorophylliens en réponse à ces flashes. On peut ainsi mesurer une fluorescence minimale (F_0) et une fluorescence maximale (F_m). Le rapport $(F_m - F_0)/F_m$, autrement noté F_v/F_m ainsi mesuré est égal à 0,8 lorsque les plantes ne sont pas photoinhibées, et baisse avec l'intensité de la photoinhibition.

Avant la mesure, les feuilles ayant subi un stress lumineux sont incubées pendant 30min en faible lumière, permettant :

- . au site Q_A du PSII (cf. introduction, §1.2.1) d'être totalement réoxydé,
- . à la chaleur accumulée à proximité du PSII de se dissiper. Cette chaleur peut être importante. Elle est due à l'établissement du gradient de protons transmembranaire (cf. introduction, §1.2.1), qui peut être de forte amplitude lorsque la formation d'ATP est limitante. Un laps de temps de 20 min permet de dissiper ce gradient de protons,
- . une migration retour des antennes collectrices vers le PSII si elles avaient subi une transition d'état au cours du stress appliqué (cf. introduction, §1.3.2).

Cette précaution permet de mesurer spécifiquement la fluorescence émise par les chlorophylles associées au PSII en liaison avec un problème de photoinhibition, c'est à dire de destruction de la protéine D1 du PSII (cf. introduction, §1.3.2)

5) Analyse des pigments

5.1) Extraction des pigments de feuilles de tabac

100mg de feuille fraîchement prélevée sont immédiatement congelés dans l'azote liquide, lyophilisés, puis broyés dans un petit mortier, ceci en présence de 400 μ l de méthanol contenant 10mM de Tris pH 7,5 (afin d'éviter l'acidification du broyat). La suspension obtenue est transférée dans un eppendorf de 2.5ml à capuchon étanche. Le mortier et pilon sont lavés plusieurs fois par du méthanol pur afin de récupérer tout le broyat.

L'échantillon est alors centrifugé pendant 5 min à 12000rpm et 4°C et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Le culot restant est re-extrait au méthanol en vortexant (et en re-broyant éventuellement le culot) jusqu'à obtenir un culot blanc.

Les surnageants sont groupés (dans un eppendorf de 2.5ml à capuchon étanche) et re-centrifugés pour éliminer tout résidu insoluble (qui risque de colmater la colonne HPLC).

Le volume de l'échantillon peut alors être réduit par évaporation complète sous vide (ou courant azote) et re-dissolution dans quelques centaines de μl de méthanol. L'échantillon est alors à nouveau centrifugé avant prélèvement de 50 μl à injectés sur une colonne d'HPLC.

5.2) Extraction des pigments de feuilles de Benoîte

Les feuilles à analyser sont récoltées et immédiatement congelées dans l'azote liquide, puis lyophilisées. Les pigments sont extraits grâce au Diméthyl Formamide (DMF), à raison d'environ 500 μl pour 10 à 20mg de matière sèche. Le DMF est donc ajouté à l'échantillon à l'obscurité et au froid. Après avoir passé un courant d'azote sur l'échantillon, il est stocké à l'obscurité et à 4°C pendant 2 à 5 jours. Après ce laps de temps, il est centrifugé 2 fois pendant 15 minutes à 14000rpm et à 4°C pour éliminer tout résidu insoluble et 50 μl sont prélevés pour injection sur une colonne d'HPLC.

5.3) Extraction des pigments de fruits de tomate

3 demi-fruits (provenant de 3 prélèvements indépendants) sont congelés dans l'azote liquide puis lyophilisés. Ils sont broyés et 100mg sont récupérés et additionnés de 1ml de méthanol, puis l'ensemble est mélangé jusqu'à dissolution. 1ml de Tris-HCl 50mM pH 7,5 est ajouté, puis 2 à 3ml de chloroforme. Après mélange et centrifugation, la phase chloroformique inférieure est récupérée. La phase aqueuse est re-extraite de la même façon. Les phases chloroformiques sont groupées, évaporées sous azote gazeux, puis resuspendues dans de l'acétate d'éthyl. 50 μl sont alors injectés sur une colonne d'HPLC.

5.4) Analyse par HPLC

L'analyse a été réalisée sur une chaîne Varian comprenant un passeur automatique ProStar 410, une pompe ProStar 240, et un détecteur à barrettes de diodes (modèle 330). Une colonne en phase inverse C30 5 microns (250 x 4,6 mm) de marque YMC (Kyoto, Japon; Schermbeck, Allemagne) a été utilisée avec une pré-colonne de même type (20 x 40 mm) selon le protocole décrit par Fraser *et al.* (2000) avec quelques modifications mineures. La phase mobile comprend de l'eau/méthanol (20/80 v/v, en présence de 0.2 % acétate d'ammonium) (A) du méthanol (B) et du tert-methyl-butyl ether (C). L'élution consiste en 10 min de solvant A (5%) et B (95%), puis d'un saut à 5% A, 80 % B et 15 % C suivi d'un gradient jusqu'à 5% A, 30% B, 65 % C étalé sur 25 min. Les flux sont de 1 ml/min et la température de la colonne maintenue à 30°C.

Les pigments ont été identifiés par leur temps de rétention et leur spectre dans le visible par comparaison à des standards (logiciel PolyView 2000, Varian).

III) Production de plants de tomates transgéniques surexprimant PTOX

1) Construction

L'ADNc entier de PTOX d'*Arabidopsis thaliana* a été amplifié par PCR en utilisant des amorces contenant pour l'une le site de restriction de l'enzyme Xho I (amorce 5' : 5'-CCGCTCGAGCCTGACGGAGATGGCGGCGATTCAGG), et pour l'autre le site de restriction de Sac I (amorce 3' : 5'-CCCGAGCTCTTATTAAGTTGTAATGGATTTCTTGAGGC). Ce fragment a été introduit dans le vecteur binaire pKYLX71::35S (apportant le gène de résistance à la Kanamycine), digéré par les mêmes enzymes. L'At-PTOX a été placé sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV). La séquence complète de PTOX, depuis 9 nucléotides avant le codon initiateur jusqu'au 2^{ème} codon stop a été introduit en orientation sens entre les sites Xho I et Sac I. (Joët *et al*, 2002).

2) Préparation des agrobactéries

2.1) Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

Afin de pouvoir transformer *Agrobacterium tumefaciens* (souche LB4404) (Hoekema *et al.*, 1983), il est dans un premier temps nécessaire de rendre des agrobactéries compétentes. 2ml d'une pré-culture en phase exponentielle ayant poussé à 28°C dans du YEP (bactopeptone 10g/l, extrait de levure 10g/l, NaCl 5g/l) sont transférés dans 50ml de milieu YEP et mis en culture jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,5. Les cellules sont alors incubées pendant 10min dans la glace puis culottées par centrifugation pendant 5min à 3000g et 4°C. Elles sont resuspendues dans 1ml de CaCl₂ 20mM, aliquotées par 100µl et stockées à -80°C.

A 100µl d'*Agrobacterium tumefaciens* rendues compétentes sont alors ajoutés 5 µl de la construction. Après avoir été mélangées délicatement, les cellules subissent un choc thermique de 5min dans l'azote liquide suivies d'1min à température ambiante, puis l'ensemble est incubé pendant 20min à 37°C. Après addition d'1ml de LB (bactotryptone 10g/l, extrait de levure 5g/l, NaCl 5g/l, pH 7,5), les bactéries sont laissées à incuber pendant 2 à 4h à 28°C et sous une agitation de 150rpm.

Après ce laps de temps, les bactéries sont centrifugées en conditions stériles pendant 3min à 4500rpm, et la plus grande partie du surnageant est enlevée. Le reste permet de resuspendre le culot bactérien, qui est étalé sur une boîte (LB, agar 15g/l, kanamycine 50mg/l, rifampicine 50mg/l, streptomycine 500mg/l).

2.2) Extraction de l'ADN d'*Agrobacterium tumefaciens*

Après avoir transformé les agrobactéries dans l'optique d'infecter et de transformer des tomates, il est nécessaire de vérifier que la construction introduite dans la bactérie est bien la construction souhaitée.

Une colonie d'agrobactéries sert à inoculer 1ml de YEP additionné de kanamycine 50mg/l, de rifampicine 50mg/l et de streptomycine 500mg/l, et la culture s'effectue

pendant 1 nuit à 28°C sous agitation importante. La culture est alors transférée dans un tube Eppendorf et centrifugée pendant 30 secondes à 12000rpm. Le culot est resuspendu dans 0,3ml de TENS (Tris 10mM pH 8, EDTA 1mM, NaOH 100mM, SDS 0,5%), puis incubé à température ambiante pendant 10min. 30 µl de phénol sont alors ajoutés et le tube est vortexé doucement pendant quelques secondes. On ajoute alors 150µl d'acétate de sodium 3M, pH 5,2, on agite l'ensemble doucement et on laisse à précipiter à -20°C pendant 15 minutes. Après une centrifugation de 3 minutes à 12000rpm, le surnageant est récupéré et additionné de 900µl d'éthanol 100%. Après mélange de l'ensemble par inversion, l'ADN est laissé à précipiter pendant 30min à -20°C. Après centrifugation pour récupérer un culot d'ADN, celui-ci est lavé à l'éthanol 70%, puis séché suite à l'addition d'éthanol 100%. Il est finalement repris dans un volume d'environ 20µl d'eau stérile.

2.3) Vérification de la construction chez *E. coli*

L'ADN plasmidique isolé à partir d'agrobactéries est la plupart du temps obtenu en très faible quantité et peu apte aux digestions enzymatiques. C'est pourquoi il est nécessaire de passer par un étape de vérification de la construction chez *E. coli*.

5µl d'ADN plasmidique servent à transformer 200µl de cellules d'*E. coli* XL1-Blue rendues compétentes (Sambrook *et al*, 1989, pp1.82 à 1.84). L'ensemble est mélangé délicatement dans la glace puis laissé à incuber pendant 45min. Après ce laps de temps, on fait subir aux bactéries un choc thermique de 3min à 37°C. 1ml de LB est alors ajouté et les bactéries sont mises à incuber pendant 1h à 37°C. Après centrifugation pour réduire le volume de bactéries, celles-ci sont étalées sur boîte (LB, agar 15g/l, kanamycine 50mg/l)

Afin d'isoler de l'ADN plasmidique de ces bactéries transformées, quelques colonies sont mises en culture à 37°C sur la nuit dans 2ml de LB contenant 50mg/l de kanamycine. Au matin, les cultures sont transférées dans des tubes eppendorf propres et sont centrifugées pendant 15 secondes à 14000rpm. Le surnageant est alors enlevé en laissant un peu moins de 50µl dans le tube, ceci afin de pouvoir reprendre le culot en vortexant dans le volume résiduel. On ajoute alors 300µl de TENS (cf. §1.2.2) et le mélange est vortexé quelques secondes. 150µl d'acétate de potassium 3M pH 4,7 sont ajoutés et les tubes sont vortexés pendant 1 seconde puis centrifugés pendant 2min à 12000rpm et 4°C. Le surnageant est récupéré et additionné d'1ml d'éthanol à 100%. Après mélange par inversion, l'ensemble est centrifugé pendant 2min à 12000rpm, et le culot d'ADN est alors lavé à l'éthanol 70% puis séché suite à l'addition d'éthanol 100%. Il est finalement repris dans un volume d'environ 20µl d'eau stérile.

5µl de cette préparation servent alors à une réaction de digestion pendant 1 à 2h à 37°C avec les enzymes permettant de vérifier la construction et dans le tampon adéquat.

3) Transformation des tomates

On utilise comme plante modèle la tomate (*Lycopersicon esculentum*), cultivar Micro-Tom (Micro tomato) décrite par Meissner *et al.* (1997). Cette variété à phénotype nain ne diffère des variétés "standard" qu'au niveau de 2 gènes. Elle possède un temps de

génération relativement court et, tout comme les variétés de tomates standard, peut être transformée par *Agrobacterium tumefaciens*.

La transformation des tomates s'effectue par infection par des agrobactéries d'explants issus de cotylédons de ces plantes.

La première étape de culture consiste donc à stériliser les graines de tomates afin d'obtenir des cotylédons cultivés de façon stérile sur milieu gélosé. Les graines sont trempées dans 10ml d'éthanol 50% pendant 30 à 60 secondes puis pendant 30min dans une solution d'eau de javel à 1,25%. Elles sont ensuite soigneusement rincées en utilisant 5 fois 50ml d'eau pure stérile.

Afin de synchroniser la germination des graines, on laisse ces dernières s'imbiber d'eau pendant une journée (ou une nuit). On sème alors 4 à 5 graines par boîte magenta sur milieu MSR3/2 (milieu MS (SIGMA) 2,2g/l, Saccharose 15g/l, Agar 8g/l, pH 5,9 avec KOH). Les graines sont mises à germer dans une chambre de culture avec 16 h de jour à 26 °C. Les cotylédons peuvent être utilisés 7-8 jours après le semis (5-6 jours après germination) avant que les vraies feuilles n'apparaissent.

Deux jours avant la date prévue pour l'infection, on met en culture 2 colonies d'agrobactéries portant la construction d'intérêt dans 2ml de LB + kanamycine 25mg/l, ceci à 28°C pendant la nuit. Le lendemain (donc à J-1), les 2 tubes sont remis en culture avec 5ml de LB additionné de kanamycine 25mg/l, ceci à 28°C pendant la nuit.

En parallèle, les explants de cotylédons sont préparés. La partie centrale des cotylédons est récupérée en conditions stériles et coupée en deux, chaque morceau constituant un explant (à partir d'une graine, on a 2 cotylédons soit 4 explants). Ces explants sont placés à raison de 10 par boîte de Pétri contenant du milieu KCMS Agar (MS salt (SIGMA) 4,4g/l, KH₂PO₄ 200mg/l, saccharose 20g/l, thiamine 0,9mg/l, acétosyringone 200µg/l, 2,4D 200µg/l, kinétine 100µg/l pH 5,8 avec KOH, agar 8g/l). Les boîtes sont entourées de parafilm et conservées en chambre de culture pendant 1 journée.

Le jour de la transformation, les cultures d'agrobactéries sont centrifugées pendant 10min à 3000rpm et 4°C (JOUAN CR412) et sont resuspendues par agitation douce dans le même volume de KCMS liquide (MS salt (SIGMA) 4,4g/l, KH₂PO₄ 200mg/l, saccharose 20g/l, thiamine 0,9mg/l, pH 5,8 avec KOH) additionné de 2,4D 200µg/l, de kinétine 100µg/l et d'acétosyringone 200µg/l. L'ensemble est dilué afin d'obtenir une DO₆₀₀ d'environ 0,1 par boîte de Pétri.

Les explants sont blessés (c'est à dire légèrement écrasés à l'aide de la pince) et placés dans la suspension bactérienne à raison de 40 par boîte. Ils sont immergés 1 par 1, et laissés au contact de la suspension pendant 30 secondes. Ils sont alors retirés et épongés sur papier Whatman stérile puis replacés dans les boîtes de Pétri dans lesquelles ils avaient été conditionnés. Les boîtes sont alors à nouveau entourées de parafilm, enveloppées de papier aluminium et placées en salle de culture à 25°C pendant 2 jours.

4) Régénération et culture des plantes transformées

Après 2 jours de coculture, les explants sont débarrassés des agrobactéries par rinçage dans un bêcher de 250ml contenant 150 ml de KCMS additionné de 2,4D, de kinétine,

d'acétosyringone et de carbénicilline 400mg/l. (cf. §1.3). Les explants sont donc plongés dans cette solution et sont laissés au repos pendant 10 à 15min, ce qui permet aux agrobactéries de sédimenter. Les explants sont alors récupérés 1 à 1, séchés sur papier Whatman stérile puis placés sur boîte de Pétri contenant du milieu ZZ (MS salt (SIGMA) 4,4g/l, saccharose 30g/l, vitamines de Nitsch 500X 2ml/l, zéatine 2mg/l, carbenicilline 400mg/l, kanamycine 100mg/l, pH 5,8 avec KOH, agar 8g/l). Ils sont alors cultivés en chambre de culture à 25°C et repiqués tous les 15 jours afin d'une part de renouveler la kanamycine, et d'autre part de stimuler la croissance. Après un premier repiquage avec une concentration de carbenicilline à 400mg/l, les repiquages suivant s'effectuent en abaissant cette concentration à 250mg/l. (Vitamines de Nitsch 500X : dans 40ml d'eau contenant une pointe de KOH, dissoudre 100mg d'acide nicotinique, 8mg de pyridoxine, 1mg de biotine, 40mg de glycine et 10mg d'acide folique, puis stériliser sur filtre 0,22µm.)

Lorsque les bourgeons commencent à être bien définis (5 à 10mm) et bien développés (ils touchent le couvercle de la boîte), ils sont placés sur milieu DEV (MS salt (SIGMA) 4,4g/l, saccharose 20g/l, vitamines de Nitsch 500X 2ml/l, carbénicilline 250mg/l, kanamycine 50mg/l, pH 5,8 avec KOH, agar 8g/l) dans des boîtes de Pétri hautes, et les parties de cal mort sont découpées. Lorsque les bourgeons commencent à former une petite plantule, ils sont isolés et repiqués dans des boîte magenta, toujours sur milieu DEV. Lorsque des racines se forment, les plantules sont repiquées sur milieu ENR (MS salt (SIGMA) 2,2g/l, saccharose 10g/l, vitamines de Nitsch 500X 2ml/l, carbenicilline 250mg/l, kanamycine 50mg/l, pH 5,8 avec KOH, phytigel 2,5g/l).

Après quelques jours, les plantes peuvent être mises en terre. Elles sont dans un premier temps protégées sous film saran afin de permettre une meilleure humidification de leur environnement proche par transpiration, puis le film est progressivement enlevé, et les plantes se développent normalement en terre et à 25°C, sous arrosage régulier.

5) Vérification des plantes transgéniques

La présence du transgène chez les plantes obtenues est vérifiée par PCR sur l'ADN génomique de ces dernières.

De jeunes feuilles sont récoltées dans des tubes Eppendorf de 1,5ml. Les tubes sont refroidis dans la glace avant broyage. Les feuilles sont broyées manuellement dans les tubes à l'aide d'un piston stérile (lavé à eau distillée stérile puis à l'éthanol 70%) pendant 1 minute. On ajoute alors 200µl de tampon de lyse (CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) 1%, Tris-HCl 0,2M pH 7,5, EDTA 0,05M, NaCl 1M, β-mecaptoéthanol 0,02%, sarcosyl 0,2%). Après agitation vigoureuse pendant 10 sec, les tubes sont placés à 65°C pendant 15 min. Les tubes sont alors laissés à refroidir à température ambiante pendant au moins 5 min. 200µl de chloroforme sont ajoutés et les tubes sont agités pendant 30 sec vigoureusement jusqu'à émulsion. Les deux phases sont séparées par centrifugation (14000rpm, 5 min, 4°C). 200µl d'isopropanol sont ajoutés au surnageant pour favoriser la précipitation des ADN (afin d'éviter la précipitation de contaminants, il est très important que l'échantillon ne reste pas plus de 5min au contact de l'isopropanol). Suite à une centrifugation (14000rpm, 30 secondes,

4°C), le culot est lavé à l'éthanol 70% (v/v) puis rincé à l'éthanol 100% (v/v). L'ADN est séché et resuspendu dans 20µl d'eau et conservé à -20°C. 1µl de cette suspension est par la suite utilisé pour chaque réaction de PCR (cf. partie II, §2.1.2).

La présence et la surexpression de PTOX est alors vérifiée par western blot comme décrit précédemment (partie I, § 5.3 et partie II, § 2.2).

IV) Analyses de séquences

1) Logiciel d'analyse

Les différentes séquences analysées dans ce manuscrit l'ont été à l'aide du logiciel 'BioEdit Sequence Alignment Editor' version 5.0.9 (copyright Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University), disponible et téléchargeable gratuitement sur <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

Lors de l'utilisation de ce logiciel, les alignements multiples de séquences s'effectuent grâce au programme Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

2) Liste des organismes et de leurs abréviations

- Abel** *Atropa belladonna*.
- Acap** *Ajellomyces capsulatus*.
- Anig** *Aspergillus niger*.
- Atha** *Arabidopsis thaliana*.
- Atum** *Agrobacterium tumefaciens*.
- Bfuc** *Botryotinia fuckeliana*.
- Bgra** *Blumeria graminis*.
- Btau** *Bos taurus*.
- Calb** *Candida albicans*.
- Cann** *Capsicum annuum*.
- Cele** *Caenorhabditis elegans*.
- Cglo** *Chaetosphaeridium globosum*.
- Cneo** *Cryptococcus neoformans*.
- Crei** *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Cros** *Catharanthus roseus*.
- Ddis** *Dictyostelium discoideum*.
- Dmel** *Drosophila melanogaster*.
- Enid** *Emericella nidullans*.
- Gmax** *Glycine max*.
- Hsap** *Homo sapiens*.
- Hvul** *Hordeum vulgare*.
- Lesc** *Lycopersicon esculentum*.
- Ljap** *Lotus japonicus*.
- Mfru** *Monilinia fructicola*.
- Mgri** *Magnaporthe grisea*.
- Mmus** *Mus musculus*.

Mpol *Marchantia polymorpha*.
Ncra *Neurospora crassa*.
Noli *Nephroselmis olivacea*.
Nsyl *Nicotiana sylvestris*.
Ntab *Nicotiana tabacum*.
Oela *Oenothera elata*.
Osat *Oryza sativa*.
Pano *Podospora anserina*.
Pans *Podospora anserina*.
Pden *Paracoccus denitrificans*.
Pnud *Psilotum nudum*.
Psti *Pichia stipitis*.
Ptre *Populus tremula*.
Rcap *Rhodobacter captulatus*.
Rgla *Ranunculus glacialis*.
Sgut *Sauromatum guttatum*.
Sole *Spinacia oleracea*.
Stub *Solanum tuberosum*.
Syne *Synechocystis* spPCC6803.
Taes *Triticum aestivum*.
Tbru *Trypanos brucei*.
Telo *Thermosynechococcus elongatus*.
Vina *Venturina inaequalis*.
Vung *Vigna unguiculata*.
Zmay *Zea mays*.

CHAPITRE 1 :
EXPRESSION DE PTOX EN SYSTÈME
BACTÉRIEN
IMMUNODÉTECTION DE PTOX DANS LES
SOUS-COMPARTIMENTS PLASTIDIAUX

CHAPITRE 1 :

EXPRESSION DE PTOX EN SYSTÈME BACTÉRIEN - IMMUNODÉTECTION DE PTOX DANS LES SOUS-COMPARTIMENTS PLASTIDIAUX

L'étude de la protéine PTOX nous a amené à la surproduire dans un système bactérien. Dans ce chapitre sont expliquées les différentes étapes de travail, depuis la première production de la protéine recombinante étiquetée d'*Arabidopsis thaliana* chez *E. coli* jusqu'à la détection de la protéine chez différents organismes.

RESULTATS & DISCUSSION

1) Production de PTOX dans un système bactérien

1.1) Surproduction de PTOX

Les conditions de cultures du clone portant la construction pQE IM 2+3 décrite dans la partie "matériels & méthodes" (partie I, § 2.1), et permettant l'expression de la partie mature de PTOX d'*Arabidopsis thaliana*, ont été optimisées afin d'obtenir la meilleure surproduction possible de PTOX. Après avoir testé différents milieux et différentes températures, il s'est avéré que la meilleure production était obtenue à 37°C en milieu minimum. L'induction de la production de la bactérie par addition d'IPTG provoque un ralentissement de croissance très net, signe d'une perturbation du métabolisme bactérien : PTOX pourrait être toxique pour la cellule.

Ceci explique vraisemblablement le faible niveau de production de la protéine que nous avons atteint, visible sur la figure 1.1. On voit donc ici que la protéine recombinante produite l'est en assez faible quantité et qu'elle présente une taille apparente après SDS-PAGE d'environ 40KDa (pour une taille théorique d'environ 36KDa).

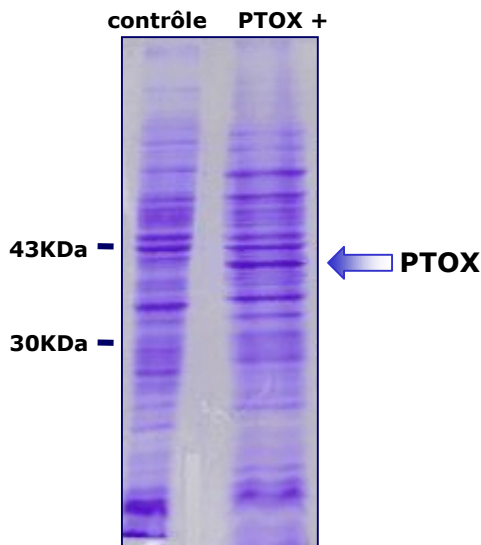


Fig 1.1:

Production de PTOX par *E. coli*: le clone pQE IM 2+3 est cultivé en milieu minimum à 37°C, et l'induction de la production de la protéine s'effectue par addition d'IPTG 40µM lorsque la culture atteint une DO_{600} d'environ 0,4. Elle se poursuit alors pendant 6 heures. Visualisation de la protéine recombinante par SDS-PAGE 12,5% d'extraits bactériens totaux. Coloration du gel au bleu de coomassie Le contrôle correspond à une bactérie de même souche portant le même vecteur d'expression (pQE31) sans l'insert PTOX.

1.2) Localisation de PTOX

Afin de savoir quelles conditions de purifications utiliser avec PTOX, il était important de savoir à quel type de protéines nous étions confrontés. L'AOX étant une protéine membranaire ou liée à la membrane (cf. introduction, §4), il était donc intéressant de savoir dans quelle fraction était située PTOX.

La figure 1.2 présente le profil de protéines après un fractionnement d'un extrait bactérien produisant PTOX en fraction soluble et différentes fraction insolubles, selon la présence de détergent faible (protéines liées à la membrane) ou d'urée à différentes concentrations (protéines membranaires ou corps d'inclusions).(cf. matériels & méthodes, partie I, §3.1). On voit ici qu'aucune bande correspondant à PTOX n'est visible dans la fraction soluble. En revanche, on retrouve un peu de PTOX dans les 3 fractions protéiques insolubles, avec une accumulation de PTOX dans les corps d'inclusion ainsi que dans les protéines liées aux membranes : PTOX n'est donc pas une protéine soluble.

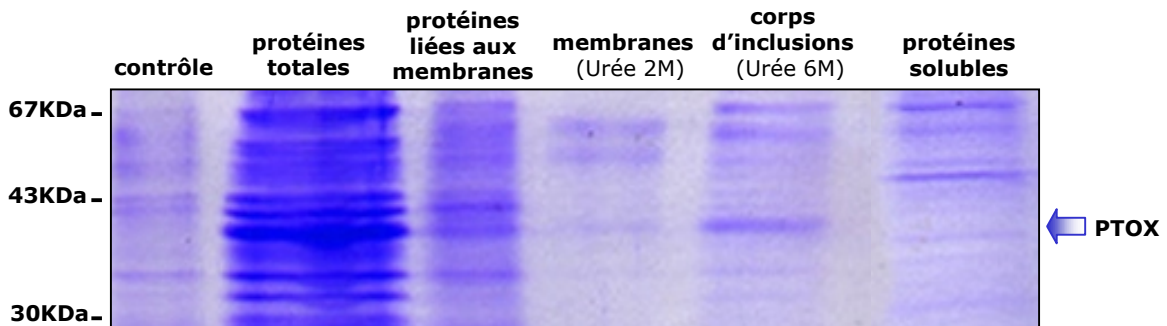


Fig 1.2: Localisation de PTOX parmi les différentes fractions protéiques bactériennes. SDS-PAGE 12,5% et coloration au bleu de coomassie. Le contrôle correspond au profil protéique avant induction par l'IPTG.

Les corps d'inclusion, agrégats de protéines précipitées, se forment lorsque la protéine n'est pas produite dans son environnement naturel, à des concentrations locales plus élevées que les concentrations habituelles. En effet, la protéine surproduite ne trouve pas nécessairement chez *E. coli* les agents assurant son repliement, comme les chaperonines ou certains cofacteurs métalliques et il est possible que la cinétique de production soit plus rapide que la cinétique de repliement, ce qui favorise les interactions hydrophobes et la précipitation de ces protéines. (Sauge-Merle, 1998). Une accumulation de PTOX dans des corps d'inclusion a donc une conséquence pratique sur les expériences à venir : afin de purifier le maximum de protéine recombinante, il faudra se placer dans des conditions dénaturantes et en présence d'urée. D'autre part, si l'on cherche à obtenir une protéine fonctionnelle (afin de rechercher son activité, cf. chapitre 2), il faudra par contre empêcher la formation de corps d'inclusion ceci en limitant la quantité d'inducteur (40µM d'IPTG) (Sauge-Merle, 1998). Cette dernière condition de faible concentration en inducteur est déjà celle utilisée dans les expériences que nous avons décrites précédemment, mais elle ne suffit pas seule à empêcher la formation de ces corps d'inclusion. C'est pourquoi par la suite, lorsque la protéine doit être obtenue sous forme active, une température de culture inférieure a été utilisée. En effet, à 30°C, *E. coli* n'est plus capable de former des corps d'inclusion. Respecter ces conditions afin d'éviter la formation de ces structures insolubles est d'autant plus important que la protéine est

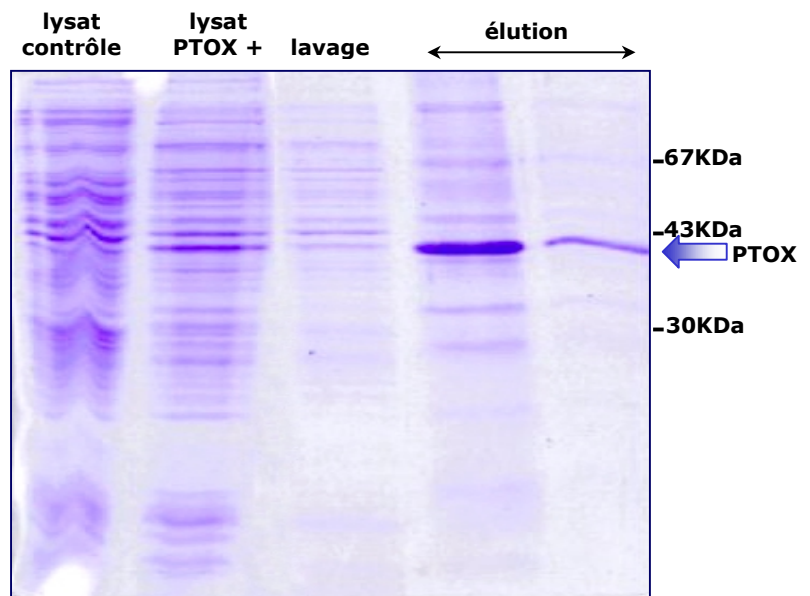
produite en quantité relativement modérée, et il sera donc crucial de favoriser l'introduction de PTOX au sein des complexes membranaires lorsque nous chercherons à la faire interagir avec eux.

1.3) Purification de PTOX

Grâce à la présence d'une étiquette de résidus d'histidine sur la protéine recombinante, il est possible de la purifier par affinité sur une matrice de nickel (cf. matériels & méthodes, partie I, § 3.2). Les différentes étapes de cette purification sont visualisées sur la figure 1.3. On voit ainsi que ce système permet d'obtenir une assez bonne quantité de protéine correctement purifiée. Cette étape de purification n'est pas parfaite et il est clairement visible qu'il reste quelques bandes contaminantes. Afin de produire un anticorps dirigé contre cette protéine, la partie du gel contenant la bande recombinante a donc été découpée et a servi d'antigène pour la production de notre sérum.

Fig 1.3:

Visualisation des étapes de purification de la protéine recombinante produite en système bactérien par SDS-PAGE 12,5% et coloration au bleu de coomassie. La protéine est purifiée par affinité sur une matrice de nickel grâce à la présence de son étiquette histidine, l'élution s'effectuant grâce à l'addition de 450 mM d'imimidazole. Le contrôle correspond au clone portant le plasmide sans insert.

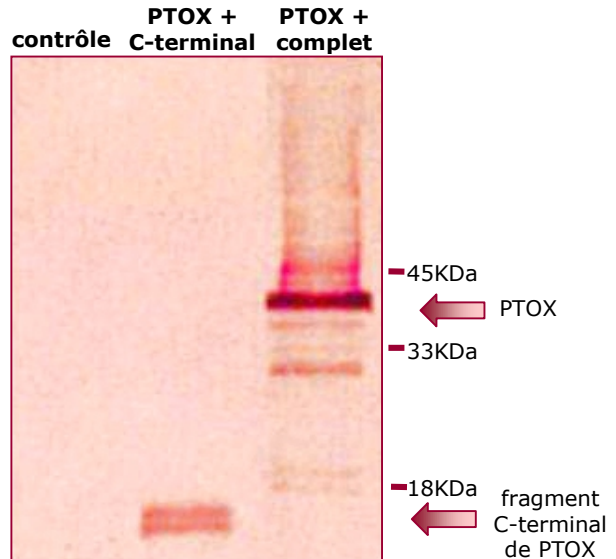


2) Caractérisation du sérum anti-PTOX

Le sérum obtenu après immunisation d'un lapin avec la protéine recombinante a dans un premier temps été testé sur des extraits protéiques bactériens afin de vérifier sa spécificité.

La figure 1.4 montre le résultat d'une immunodétection avec ce sérum sur des protéines du clone ayant permis la production de la protéine recombinante. On voit ainsi que contrairement à ce qu'on peut voir pour un clone contrôle, portant le plasmide sans insert, le sérum reconnaît une protéine de masse apparente d'environ 40KDa, ce qui correspond exactement à la taille apparente de la protéine que nous avons produite. (Josse *et al.*, 2000), les bandes visibles à des tailles inférieures correspondant vraisemblablement à une dégradation de la protéine. Ce sérum est également capable de reconnaître la partie C-terminale de PTOX d'*A. thaliana* exprimée chez *E. coli*, avec ici un doublet pouvant également correspondre à une dégradation de la protéine.

Fig 1.4:
Vérification de la spécificité du sérum anti-PTOX. SDS-PAGE d'une quantité identique de protéines totales de 3 extraits bruts bactériens (clone contrôle possédant le plasmide sans insert, clone permettant la production de la partie C terminale de PTOX, clone produisant PTOX mature), suivie d'un transfert. Immunodétection avec le sérum anti-PTOX au 1/8000.



3) Caractéristiques de la protéine recombinante

Nous avons vu que la protéine recombinante se retrouvait essentiellement dans les fractions de protéines insolubles. Néanmoins, afin d'avoir quelques informations sur sa structure native, pour savoir si par exemple, comme l'AOX, PTOX est capable de dimérisation, nous avons essayé de purifier PTOX en conditions non dénaturantes (cf. matériels et méthodes, partie I, § 3.2).

La figure 1.5 présente le profil de protéines des différentes étapes de purification : étant donné le grand nombre de bandes contaminantes, il est clair que la purification n'est pas optimale, et elle s'effectue avec un rendement plutôt faible. Ceci est en accord avec le fait que la protéine ne se retrouve pas dans la fraction des protéines solubles, mais majoritairement dans la fraction des protéines liées à la membrane, qu'on ne peut solubiliser qu'en présence de détergent (ici, la température de culture ne permet pas la formation de corps d'inclusion). On observe malgré tout une protéine migrant à la taille attendue et pouvant correspondre à PTOX majoritairement présente dans l'éluat.

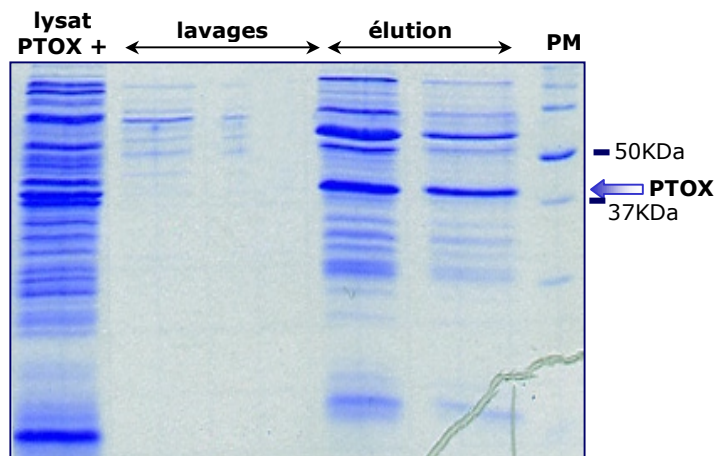


Fig 1.5: Étapes de purification par affinité et en conditions non dénaturantes (sans détergent ni urée) de la protéine recombinante produite en système bactérien. SDS-PAGE 12,5% et coloration au bleu de coomassie. PM: poids moléculaires

Ceci signifie qu'il est donc possible de retrouver PTOX dans un contexte soluble, décrochée des membranes. Ceci est donc cohérent avec le modèle théorique actuel proposé pour l'AOX mitochondriale (Andersson & Nordlund, 1999 ; cf. chapitre 2), qui propose qu'une région hydrophobe de la protéine soit capable de former une interaction avec la membrane, de façon identique à ce qui est connu pour la prostaglandine synthase et la squalène cyclase (Berthold *et al.*, 2000).

Afin de connaître la masse native de notre protéine recombinante, nous avons analysé cette même fraction éluée par électrophorèse sur un gel natif non dénaturant. Le résultat de cette expérience est visible sur la figure 1.6.

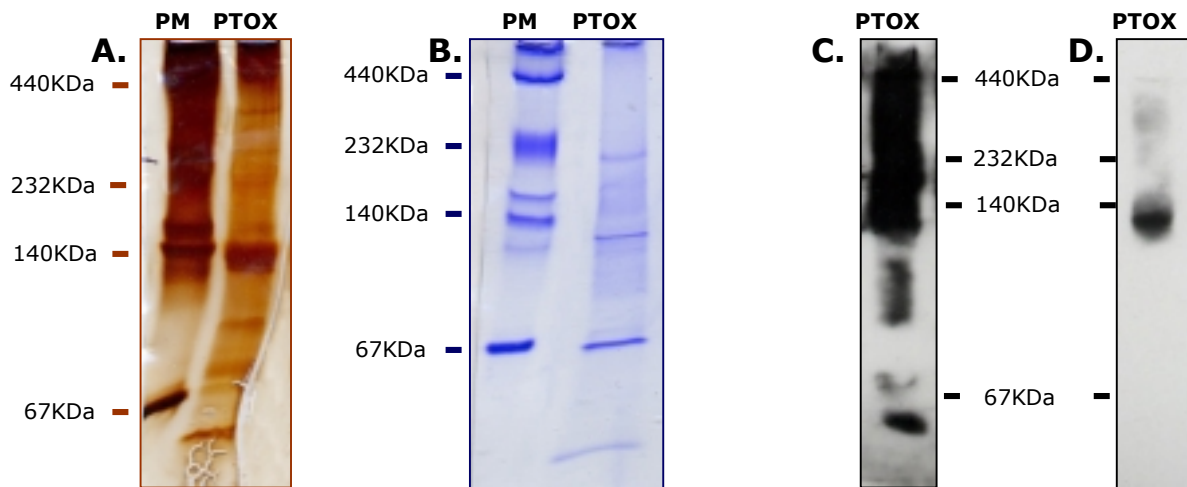


Fig 1.6: Visualisation du résultat de la purification de PTOX en conditions natives. Native-PAGE gradient (3 à 24%) en présence de 0,1% Triton X-100 d'une fraction éluée après purification en conditions non dénaturantes. A: coloration du gel à l'argent. B: coloration du gel au bleu de coomassie. C: transfert sur membrane puis immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000. D: transfert sur membrane et immunodétection avec un anti-histidine au 1/3000. PM:poids moléculaires.

Plusieurs éléments sont observables ici :

. Tout d'abord, suite à une coloration du gel natif, on voit différentes bandes apparaître, ce qui n'est pas étonnant compte-tenu de la mauvaise efficacité de purification. Les figures 1.6A et 1.6B montrent la présence de 2 bandes majoritaires, l'une autour de 67KDa, l'autre aux environs de 140KDa, cette dernière étant nettement plus visible après coloration du gel aux sels d'argent (méthode de coloration plus sensible que le bleu de coomassie). A la seule lecture de ces 2 gels, il est difficile de conclure sur la forme native de PTOX.

. L'utilisation de l'anticorps anti-PTOX afin de déterminer la bande correspondant à PTOX (fig 1.6C) montre qu'il est possible que PTOX existe sous 2 formes, correspondant à 2 tailles différentes, l'une étant le double de l'autre : les 2 bandes cités précédemment provoquent une réaction de l'anticorps. La trainée visible dans la partie haute du film montre néanmoins que PTOX semble être également sous forme agrégée difficilement

séparable sur gel. Il est également probable que notre anticorps présente ici des réactions parasites non spécifiques.

. L'anticorps dirigé contre l'étiquette d'histidine de la protéine recombinante est d'origine monoclonale et le plus souvent très spécifique. Il montre ici (fig 1.6D) que la bande correspondant à PTOX migre à une distance correspondant à un poids moléculaire apparent légèrement inférieur à 140 KDa. En conditions dénaturantes, la protéine recombinante avait une masse apparente d'environ 40KDa : il est donc possible que la protéine soit forme ici un trimère, dont l'ensemble migre légèrement plus haut que la taille attendue (120KDa), ou un tetramère, migrant par contre plus bas que la taille attendue (160KDa). Il est également possible que PTOX soit présente sous d'autres formes, mais en quantité trop faibles pour être détectées par cet anticorps.

Finalement, cette expérience ne permet pas d'identifier la formation réelle d'un multimère par la PTOX recombinante. Il est en effet très possible que la protéine, supposée insoluble, s'agrège et précipite, ne se retrouvant alors plus en conditions natives.

4) Expression de PTOX chez les plantes

4.1) Détection de PTOX chez les plantes

Après plusieurs échecs à visualiser PTOX dans des échantillons provenant de plusieurs espèces de plantes, nous en avons conclu que PTOX devait être une protéine très minoritaire, non détectable à partir d'extraction de protéines totales. Or, Carol et ses collaborateurs ont montré par transport *in organello* que PTOX est une protéine importée dans le chloroplaste (Carol *et al.*, 1999) : une façon efficace d'enrichir nos extraits de plante en PTOX était donc d'en isoler les chloroplastes.

La figure 1.7 présente une expérience de western blot effectuée à partir de protéines chloroplastiques isolées à partir de tomates sauvage ou de tomates provenant d'un mutant caractérisé au laboratoire (cf. chapitre 3) et déficient en PTOX, le mutant *ghost*.

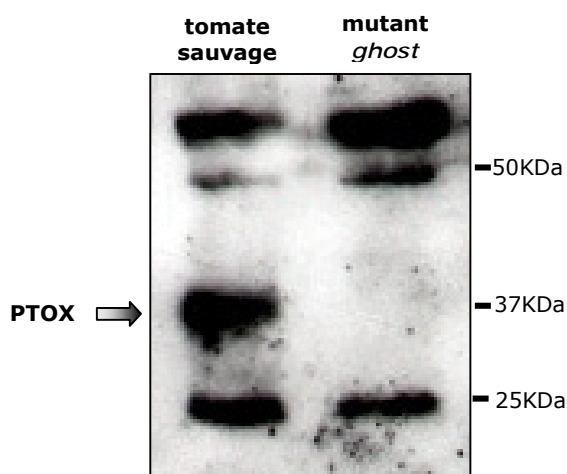


Fig 1.7:
Détection de PTOX dans des chloroplastes de tomate. SDS-PAGE 12,5% de 50µg de protéines de isolées à partir de chloroplastes de feuilles de tomates sauvage ou *ghost*, (mutant déficient en PTOX), suivie d'un transfert. Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000.

On voit alors ici que l'anticorps que nous avons produit est capable de reconnaître une protéine migrant à une taille d'environ 37KDa chez la tomate sauvage, ce qui est cohérent avec la taille que nous avons observée pour notre protéine recombinante. Cette

même protéine n'est pas visible chez le mutant déficient en PTOX, alors que la même quantité de protéine a été déposée sur le gel, comme en attestent les bandes contaminantes correspondant à des reconnaissances non spécifiques de notre anticorps : ce dernier est donc capable de reconnaître PTOX chez la tomate.

Lorsqu'elle est exprimée chez *E. coli*, nous avons vu que PTOX se retrouve majoritairement dans des fractions insolubles : une autre façon d'enrichir nos extraits protéiques en PTOX afin de détecter la protéine grâce à notre anticorps a donc consisté en une séparation des protéines de plantes en plusieurs fractions afin d'isoler les protéines insolubles (cf. matériels & méthodes, partie II §2.2.3). La figure 1.8 correspond à cette expérience. Elle présente un western blot effectué à partir de l'isolation de protéines totales ou insolubles de feuilles de tomates Micro-Tom, sauvages ou surexprimant PTOX (appelées PTOX+). Nous reviendrons au chapitre 3 sur ces dernières, mais il est ici utile de rappeler qu'elles expriment la séquence codante de PTOX d'*Arabidopsis thaliana* sous le contrôle du promoteur constitutif 35S (cf. matériels & méthodes, partie III).

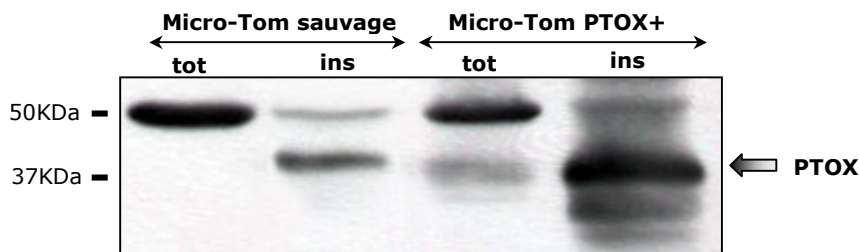


Fig 1.8: PTOX est détecté dans la fraction des protéines insolubles. SDS-PAGE de 50µg de protéines totales (tot) ou insolubles (ins) de feuilles de tomates, suivie d'un transfert. Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000.

On voit donc ici chez le sauvage un enrichissement en PTOX lorsqu'on analyse la fraction insoluble. On voit également qu'il est possible de détecter PTOX à partir de protéines totales chez la tomate transgénique surexprimant PTOX, et ce alors qu'une quantité identique de protéines a été déposée sur gel, comme en attestent les bandes supérieures contaminantes correspondant à une reconnaissance non spécifique (pistes 1 et 3). On remarque chez la plante transgénique surexprimeur l'apparition d'un doublet correspondant à PTOX (piste 4) : nous l'avons interprété comme une dégradation de la protéine, ce qui peut être cohérent avec les multiples bandes de tailles inférieures à celle de PTOX observées lorsque cette dernière est exprimée chez *E.coli*.

Ainsi notre anticorps, produit contre la protéine d'*Arabidopsis thaliana*, est capable de détecter PTOX chez la tomate, et ceci uniquement lorsque les fractions sont enrichies, soit en isolant la partie insoluble des protéines de la feuille entière, soit en isolant les chloroplastes, dans lesquels est localisée la protéine.

4.2) PTOX est localisée dans les thylacoïdes

Après avoir confirmé la localisation de PTOX dans des chloroplastes de feuilles de tomate, nous avons voulu connaître la destination précise de PTOX au sein du plaste.

Ceci nécessitait l'obtention de sous-fractions plastidiales particulièrement pures. La mise au point d'une technique d'isolation des enveloppes d'*Arabidopsis thaliana* par l'équipe de Norbert Rolland (Laboratoire de physiologie cellulaire végétale, CEA de Grenoble) nous a donc permis d'obtenir ces fractions très pures des différents compartiments plastidiaux : en effet, les enveloppes déposées ici présentent une contamination de l'ordre de 1 à 2% par des thylacoïdes après vérification par dot blot (Norbert Rolland et Solène Kowalsi, communication personnelle). La figure 1.9 présente un western blot effectué à partir des protéines de ces différents compartiments plastidiaux. Le gel coloré au bleu de coomassie (fig 1.9-A) montre que les différents échantillons ont un profil protéique différent, signe d'un fractionnement efficace. La figure 1.9-B montre que notre anticorps reconnaît une bande à la taille attendue, et ce uniquement dans les fractions chloroplastique et thylacoïdienne : PTOX se trouve donc dans les thylacoïdes, et donc en possible interaction avec les différents éléments la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique.

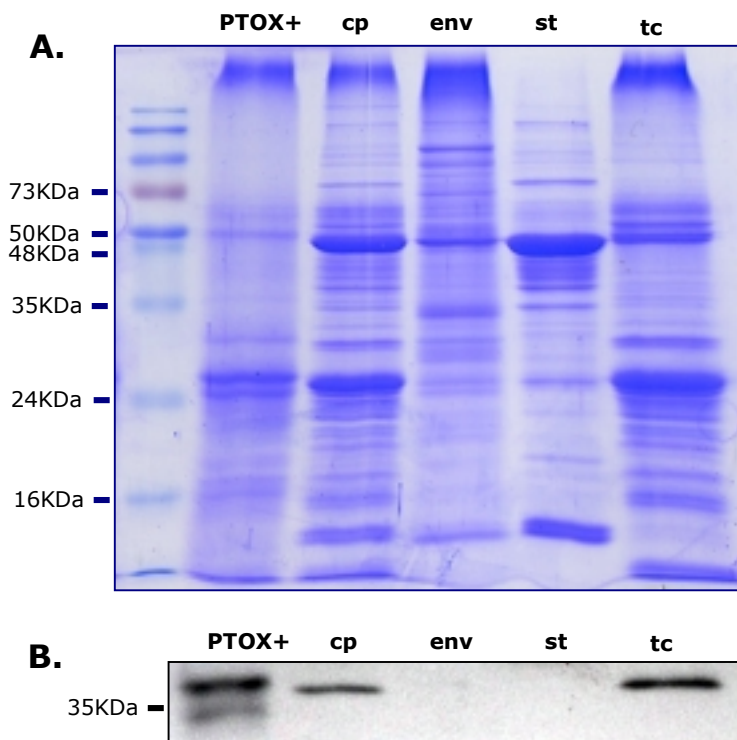


Fig 1.9:

Localisation de PTOX dans le chloroplaste. SDS-PAGE 12,5% de 20µg de protéines de différentes sous-fractions de chloroplaste d'*Arabidopsis thaliana*, suivie d'un transfert

A: gel correspondant coloré au bleu de coomassie.

B: immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000.

cp: chloroplaste, env: enveloppe, st: stroma, tc: thylacoïde, PTOX+: fraction insoluble de protéines de tomate *Mico-Tom* transgénique surexprimant PTOX

La localisation précise de PTOX au sein de membranes thylacoïdiennes a pu être effectuée à partir de fractionnements de thylacoïdes de tabacs PTOX+, produits par Thierry Joët (laboratoire d'écophysiologie de la photosynthèse, CEA, Cadarache). Ce type de sous-fractionnement est bien maîtrisé chez le tabac, mais ne permet pas de visualiser PTOX chez les plantes sauvages : il semble que PTOX soit présent en quantité très faibles chez cette espèce (caractère vérifié par des expériences de RT-PCR, non présentées ici). Aussi, la production de tabacs transgéniques possédant la même construction que décrit précédemment pour nos *Mico-Tom* (soit la séquence codante de PTOX d'*Arabidopsis thaliana* sous le contrôle d'un promoteur 35S) a permis cette localisation précise. En effet, les membranes thylacoïdiennes sont divisées en 2 domaines (lamelles et grana, cf. introduction § 1.1), la composition lipidique et protéique de ces 2 domaines étant

différente. Les photosystèmes sont ainsi distribués de façon hétérogène au sein des membranes, la plus grande partie des PSII étant localisés dans les empilements granaires, alors que la majorité des PSI et des ATP synthases se situent dans les lamelles du stroma, le cytochrome b6/f étant quant à lui distribué de manière uniforme. (Allen & Forsberg, 2001). Aussi était-il intéressant de connaître la localisation de PTOX, afin de savoir, dans l'hypothèse où elle pourrait interagir avec le transport électronique photosynthétique, quels pourraient être ses partenaires les plus proches.

La figure 1.10 présente le résultat de ce sous-fractionnement. Le gel coloré au bleu de coomassie révèle un profil protéique différent pour chaque fraction (fig 1.10-A), et l'immunodétection par notre anticorps anti-PTOX (fig 1.10-B) montre que PTOX se retrouve en majorité associées aux lamelles stromatiques et peu aux empilements granaires des thylacoïdes (Joët *et al.*, 2002). Ceci signifie donc que PTOX se situe à proximité du PSI, et également du complexe NDH plastidial (cf. introduction, § 1.3.2) (Joët, 2001) : d'un point de vue spatial, une interaction entre ces différentes protéines sont donc possibles et seront discutées ultérieurement dans ce manuscrit (cf. chapitre 3).

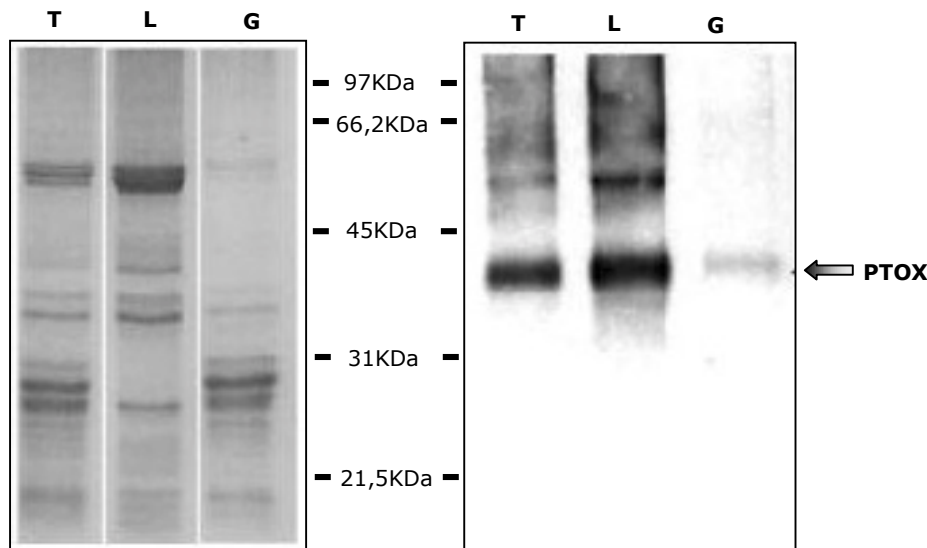


Fig 1.10: Localisation de PTOX dans des sous-fractions thylacoïdiennes. SDS-PAGE 13% de 5µg de protéines de différentes sous-fractions thylacoïdiennes de tabac PTOX+, suivie d'un transfert. A : coloration du gel au bleu de coomassie. B : Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000.

T : thylacoïdes, L : lamelles, G : grana.

4.3) PTOX est localisées dans des plastes non photosynthétiques

Le mutant *immutans* d'*Arabidopsis thaliana*, mutant déficient en PTOX, est caractérisé par un blocage de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (cf. introduction, § 3). On retrouve différents type de caroténoïdes dans le chloroplaste, où ils jouent un rôle fondamental dans la phase lumineuse de la photosynthèse (cf. introduction, § 1). Dans une autre forme de plaste, le chromoplaste, les caroténoïdes s'accumulent en quantité importantes (cf. introduction, § 3). Ces chomoplastes sont retrouvés dans les fleurs et dans les fruits.

Afin de vérifier la présence de PTOX dans les chromoplastes, et de connaître sa situation précise au sein de cet organelle, un fractionnement de chromoplastes de poivrons rouges a été réalisé. Ce fractionnement n'a pas été effectué chez la tomate, car l'obtention de chromoplastes de fruits de tomate intacts est difficile. La figure 1.11 montre ainsi qu'un peptide d'une taille apparente d'environ 40KDa est reconnu par l'anticorps, localisant PTOX dans la fraction membranaire des chromoplastes, et très faiblement dans la fraction des globules lipidiques, correspondant aux lipides de faible densité dont le contenu en protéines est réduit. PTOX n'est pas détectée dans la fraction stromatique. (Josse *et al.*, 2000).

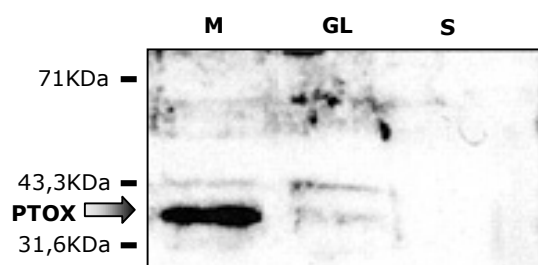


Fig 1.11:

Localisation de PTOX dans le chromoplaste de poivron. SDS-PAGE d'une quantité identique de protéines de différentes sous-fractions de chromoplastes de poivron rouge, suivie d'un transfert. Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000.

Ainsi PTOX est détectable dans les membranes non chlorophylliennes de chromoplastes de poivrons rouges, siège d'une biosynthèse de caroténoïdes massive. Ceci semble indiquer que PTOX est liée à la voie de biosynthèse des caroténoïdes, ce qui sera discuté ultérieurement dans ce manuscrit (cf. chapitre 3)

CONCLUSION

Ce chapitre nous a donc appris plusieurs informations : PTOX est une protéine de 37 à 40KDa, insoluble, membranaire ou liée aux membranes. Sa capacité de multimérisation demeure une inconnue. Elle est retrouvée en faible quantité dans les tissus verts de la plante, spécifiquement dans les thylacoïdes du chloroplaste, et majoritairement dans les lamelles stromatiques de ces thylacoïdes. Au sein des tissus producteurs de caroténoïdes, on la retrouve abondamment dans les membranes plastidiales non chlorophylliennes, siège de cette production de pigment.

Aussi ces localisations permettent-elles d'envisager plusieurs rôles pour PTOX. D'une part une participation dans la biosynthèse des caroténoïdes, et d'autre part une intervention possible au sein de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques.

Cependant, avant de s'avancer plus avant sur ces hypothèses, il faut reconnaître que ces localisations ne suffisent pas à prédire la fonction exacte de PTOX dans ces différents phénomènes. La seconde étape de ce travail a donc été de déterminer la fonction, et même l'activité enzymatique de PTOX, ce que nous allons voir à présent dans le chapitre suivant de ce manuscrit.

CHAPITRE 2 :
ACTIVITÉ DE PTOX LORS DE L'EXPRESSION
DANS UN SYSTÈME BACTERIEN

CHAPITRE 2 :

ACTIVITÉ DE PTOX LORS DE L'EXPRESSION DANS UN SYSTÈME BACTÉRIEN

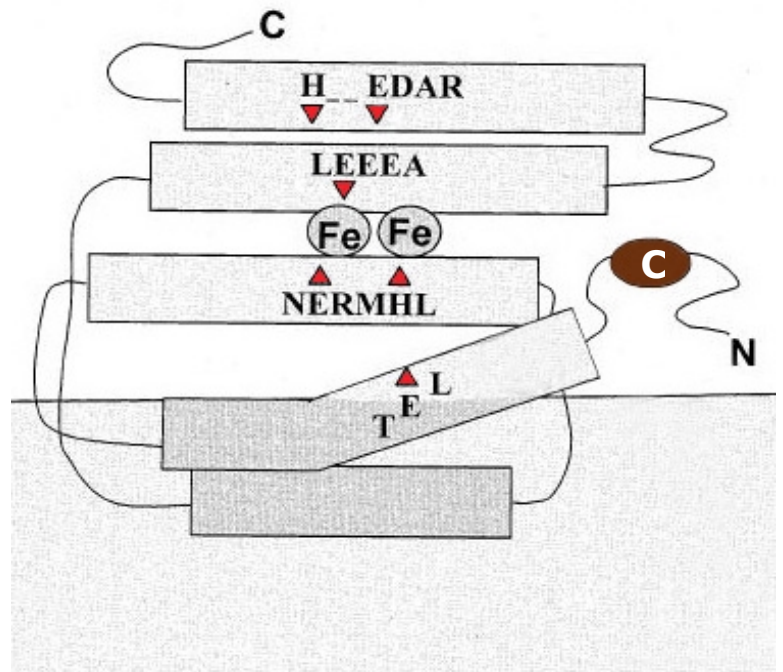
L'AOX et PTOX présentent des homologies de séquences importantes. Il est donc probable que ces protéines aient une fonction biochimique proche, ainsi qu'une structure protéique similaire. Les quelques éléments de séquences résumés ici vont nous servir de fil conducteur tout au long de ce chapitre, afin de mettre en liaison l'AOX et PTOX.

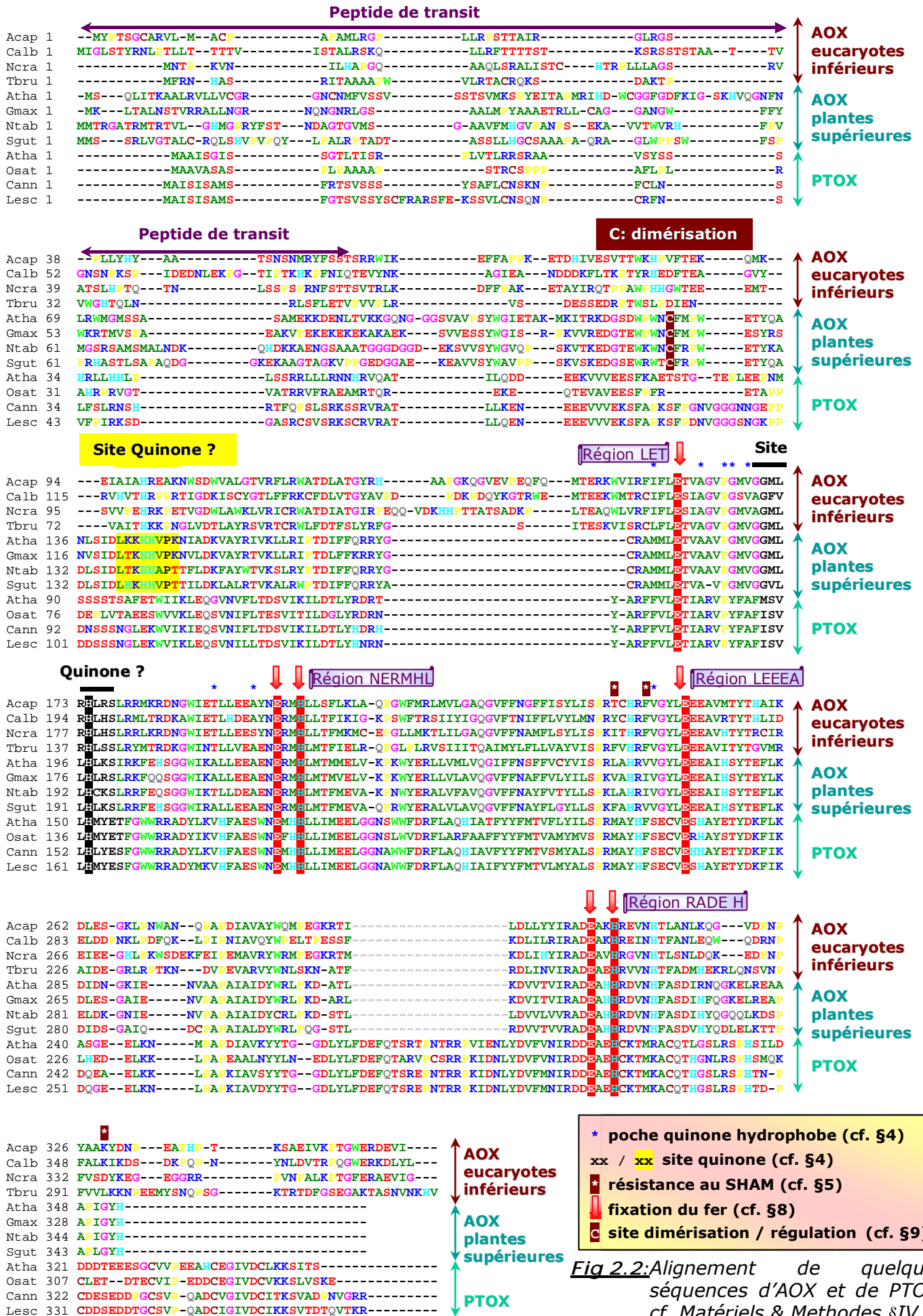
Après une première modélisation par Siedow, Umbach et Moore qui prédisaient cette protéine transmembranaire (Moore & Siedow, 1991 ; Moore *et al.*, 1995 ; Siedow *et al.*, 1995), l'AOX a plus récemment été identifiée comme étant une protéine liée à la membrane, possédant une structure et une topologie très similaires aux oxydases à 2 fer de type MMO ou RNR R2 (Andersson & Norlund, 1999 ; cf. introduction, §4.4). Cette vision de la structure de l'AOX a été confirmée suite à l'obtention de la séquence de PTOX d'*Arabidopsis thaliana* (Carol *et al.*, 1999 ; Wu *et al.*, 1999), dont les sites apparemment essentiels à la fonction enzymatique de l'AOX ont été conservés (Berthold *et al.*, 2000). Un second argument en faveur du modèle proposé par Andersson et Nordlund est venu de l'identification d'un résidu de glutamate essentiel à l'activité enzymatique de l'AOX, résidu placé de l'autre côté de la membrane par rapport au site catalytique dans le modèle de Siedow, Umbach et Moore, et au niveau du site catalytique dans le modèle actuel (Albury *et al.*, 2002).

La figure 2.1 présente la structure de l'AOX, et les régions indiquées sur le schéma peuvent se retrouver sur l'alignement de séquences de la figure 2.2 : on voit alors que les sites de fixation du fer sont universellement conservés, que ce soit au niveau des AOX d'eucaryotes inférieurs, de plantes supérieures, ou de PTOX. Par contre, il existe de nombreuses dissemblances au niveau de ces différentes séquences, dissemblances qui vont nous intéresser tout au long de ce chapitre.

Fig 2.1:

Schéma de la structure de l'AOX des plantes supérieures modélisée par Andersson et Nordlund, puis modifiée par Berthold (d'après Berthold *et al.*, 2000). Les triangles rouges correspondent aux sites prédits de fixation du fer, et le résidu de cystéine N-terminal est impliqué dans la régulation allostérique de la protéine





Il est important de noter ici qu'il existe une différence notable entre les AOX d'eucaryotes inférieurs tels que les champignons et certains protozoaires, et les AOX de plantes supérieures : les premières sont, contrairement aux secondes, incapables de dimérisation, et ne semblent pas être régulées par les acides α -cétoniques (Siedow & Umbach, 2000 ; Umbach & Siedow, 2000).

Il a été montré que l'expression de l'AOX dans une bactérie incapable de produire un hème et donc de respirer peut restaurer une croissance normale (Berthold, 1998). D'autre part, cette même étude a montré qu'il était possible de détecter une activité respiratoire liée à l'AOX dans les membranes de ces mêmes bactéries. Ainsi, une stratégie similaire a été employée pour mettre en évidence la fonction de PTOX : en exprimant cette protéine dans une bactérie, en vérifiant sa présence dans les membranes bactériennes ainsi que son activité respiratoire spécifique, nous avons voulu savoir si PTOX était également une quinol oxydase à centre Fer-Fer.

RESULTATS & DISCUSSION

1) Complémentation de l'activité respiratoire chez les bactéries *E. coli* SASX41B

Les bactéries *E. coli* SASX41B possèdent une mutation dans le gène codant pour la déhydrogénase du glutamyl-ARNt, impliquée dans la biosynthèse de l'acide aminolevulinique (Säsärman *et al.*, 1968 in Avissar & Beale, 1990). Elles sont de ce fait incapables de produire un hème fonctionnel, ce qui résulte en une absence de cytochromes oxydases bo et bd, et en conséquence une incapacité à se développer en conditions de respiration aérobie. L'expression de l'AOX d'*Arabidopsis thaliana* dans cette souche permet de restaurer une croissance en aérobiose, en permettant la réoxydation du pool des quinones (Berthold, 1998 ; Kumar & Söll, 1992). Etant donné la similitude entre PTOX et l'AOX, nous avons utilisé ce système pour voir si PTOX avait la même capacité.

La souche *E. coli* SASX41B a donc été transformée par le plasmide pQE IM 2+3, permettant l'expression de la protéine entière. Après avoir obtenu plusieurs colonies indépendantes résistantes à l'ampicilline, donc possédant le plasmide contenant PTOX, il a été impossible d'obtenir une croissance de ces bactéries sur un milieu non complétement en acide aminolévulinique.

L'échec de cette complémentation peut avoir plusieurs explications. On peut par exemple imaginer une incapacité pour PTOX à s'intégrer dans les membranes de la bactérie, ou un mauvais repliement de la protéine conduisant à la production d'une enzyme inactive ou peu active, ou encore à une surproduction en faible quantité. Une autre hypothèse pourrait provenir d'une différence de substrat : en effet, l'AOX est une protéine mitochondriale, qui utilise l'ubiquinol comme substrat, l'ubiquinol étant également présent dans les membranes d'*E. coli*. Or PTOX est chloroplastique : il est fort possible que si elle possède la même activité que l'AOX, son substrat préférentiel soit le plastoquinol, molécule absente chez *E. coli*.

Cet échec de la complémentation nous a conduits à essayer un autre système afin de démontrer l'activité de PTOX, utilisant des membranes purifiées d'*E. coli* pouvant être complémentées par l'addition de différentes molécules.

2) Principe du test d'activité

La surexpression de PTOX ne complétant pas la souche SASX41B, et cette dernière ne poussant pas en absence d'acide lévulinique, il est techniquement impossible d'obtenir des membranes d'*E. coli* dépourvues de cytochromes et utilisables dans un tel essai. La souche XL1-Blue a donc été utilisée : étant capable de synthétiser correctement les hèmes, elle produit donc des cytochromes fonctionnels.

De façon à pouvoir évaluer l'activité biochimique de PTOX en tant qu'accepteur d'électrons, il est impératif de bloquer l'activité des cytochromes bd et bo. Ces derniers sont tous les deux sensibles au KCN, respectivement à des concentrations de 1mM et 50µM (Ankaru, 1988 ; Pelmont, 1993). Nous avons donc envisagé un traitement par 2mM de KCN en faisant l'hypothèse que PTOX, à l'instar de l'AOX, serait insensible au KCN. D'autre part, afin d'optimiser cette inhibition des cytochromes par le KCN, les bactéries ont été cultivées dans des conditions d'oxygénation optimales, afin d'éviter la production massive du cytochrome bd, généralement produit en conditions de faible aérobie, et plus difficilement inhibé par le cyanure. (Ankaru, 1988 ; Jones, 1982). Des membranes bactériennes ont ensuite été préparées à partir de ces cultures pour servir de matrice au test d'activité.

La figure 2.3 décrit le fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons des membranes du colibacille au cours de la respiration aérobie (Ankaru, 1988), ce qui correspond à la situation dans laquelle nous nous placerons lors de nos tests.

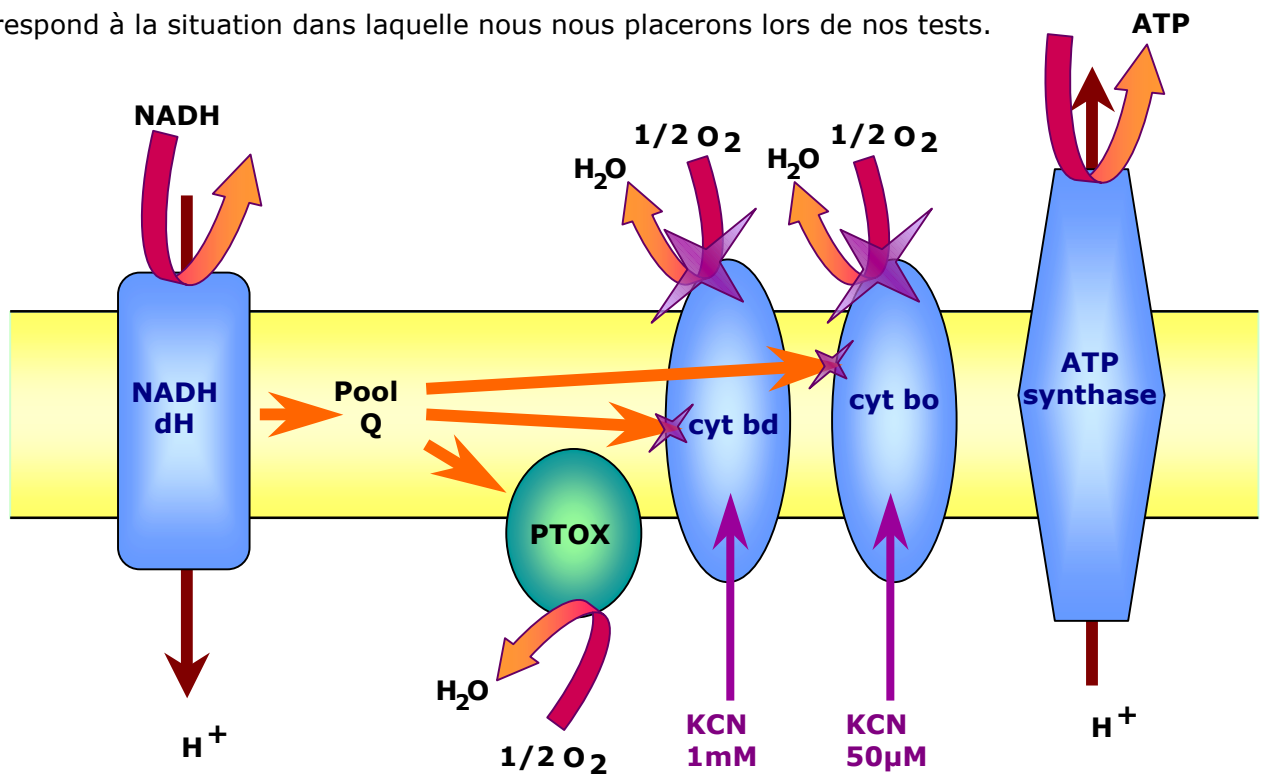


Fig 2.3: Principe du test d'activité PTOX, utilisant la chaîne de transfert d'électrons de la membrane d'*E. coli*. Les différents éléments sont décrits dans le texte.

Ainsi, le principe du test est le suivant : après addition d'un substrat respiratoire (le NADH), la NADH déshydrogénase (NADH DH) transmet ses électrons au pool des quinones, qui ne peut plus être réoxydé par les cytochromes, inhibés par l'addition de KCN. Si PTOX a une activité proche de celle de l'AOX, elle pourrait alors permettre une réoxydation des quinones et un transfert d'électrons vers l'oxygène. L'évolution de la consommation d'oxygène reflèterait ainsi l'activité enzymatique de PTOX.

Afin d'attribuer de façon certaine cette consommation d'O₂ à PTOX, et non à une activité résiduelle des cytochromes par exemple, il serait intéressant de bloquer l'activité respiratoire observée par un inhibiteur spécifique. Le SHAM et le nPG, inhibiteurs de l'AOX (cf. introduction §4.1) sont ici 2 candidats à essayer.

3) Mise en évidence de l'activité PTOX

Le système que nous utilisons ici repose essentiellement sur la mesure de l'activité respiratoire de membranes bactériennes. A chaque purification de membranes, l'état physiologique de celles-ci est variable, et les activités respiratoires peuvent être assez éloignées pour un essai utilisant les mêmes conditions expérimentales. Aussi est-il difficile dans ces conditions de faire des moyennes sur les valeurs obtenues dans des essais indépendants. C'est pourquoi nous nous sommes fiés aux tendances qui se dégagent clairement et de façon reproductible, et la plupart du temps, nous représenterons une expérience représentative d'un plus grand nombre.

Les figures 2.4-A et 2.4-B montrent l'activité de consommation d'oxygène de membranes bactériennes sauvages, ne possédant pas de PTOX. Sans apport de substrat directement utilisable par le système respiratoire, il n'y a aucune activité. L'addition d'un substrat respiratoire, le NADH, provoque une consommation d'oxygène par les membranes, consommation qui est inhibée quasi-totalement par l'addition de 2mM de KCN.

L'addition de décyloplastoquinone (PQ) à ces membranes inhibées par le KCN n'a aucune incidence sur la consommation d'oxygène (fig 2.4-A), alors que l'addition de cette même PQ avant l'inhibition des cytochromes par le KCN augmente la consommation d'oxygène d'environ 10 à 15% (fig 2.4-B).

Les figures 2.4-C et 2.4-D décrivent les résultats obtenus dans les mêmes conditions pour des membranes exprimant PTOX. On voit que dans un premier temps, le comportement de ces membranes est totalement identique à celui du contrôle sauvage : il n'y a pas de consommation d'oxygène après blocage des cytochromes par le KCN en absence de PQ (fig 2.4-C). L'addition de PQ sur ces membranes traitées au KCN entraîne une consommation d'O₂ (fig 2.4-C) correspondant à environ 15 à 20% de la consommation initiale. De façon similaire, l'addition de PQ sur des membranes non traitées au KCN entraîne une augmentation de consommation d'O₂ (fig 2.4-D). L'ajout de KCN n'inhibe pas entièrement cette consommation, et il subsiste donc une consommation résiduelle indépendante des cytochromes d et o (fig 2.5). Il est intéressant de noter que cette consommation d'O₂ résiduelle est inhibée quasi totalement par l'addition de 0,5 mM de nPG (fig 2.4-C et 2.4-D). L'activité mesurée ici est donc sensible à un des inhibiteurs spécifiques de l'AOX.

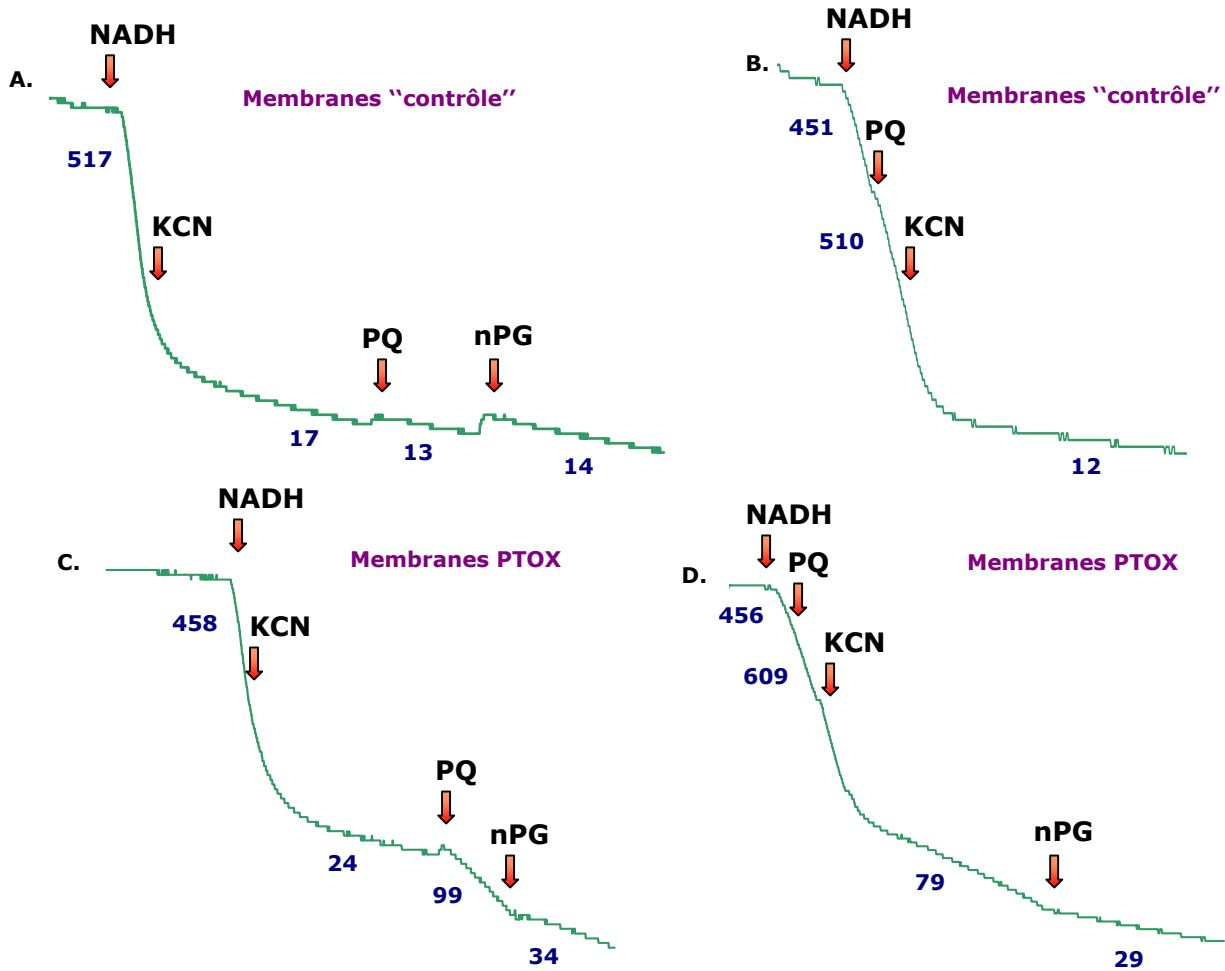
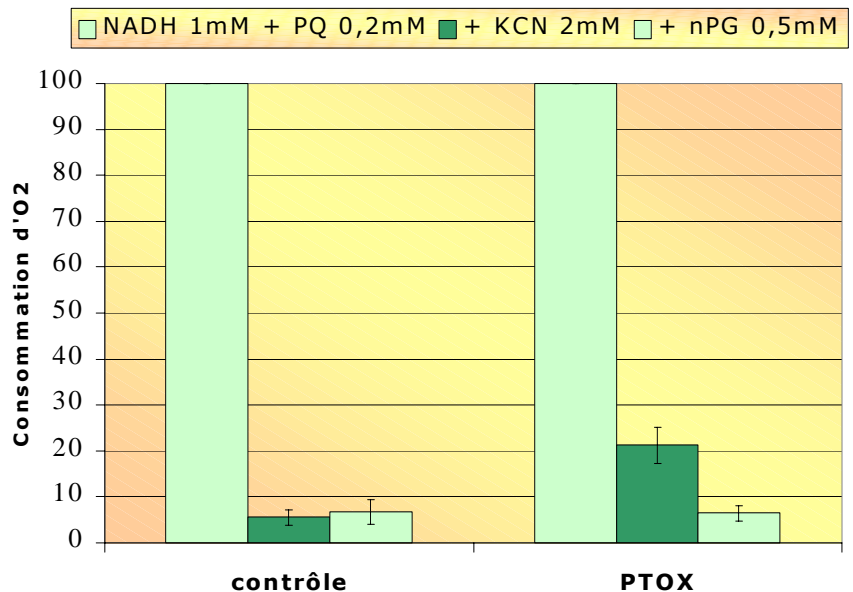


Fig 2.4: Tracés oxygraphiques: consommation d'oxygène des membranes bactériennes en fonction du temps. Les valeurs sont données en nmoles d'O₂/min/mg de protéines. A et B: membranes "contrôle", isolées à partir de bactéries n'exprimant pas PTOX. C et D: membranes isolées à partir de bactéries exprimant PTOX. Concentrations utilisées: NADH:1mM, PQ:0,2mM, KCN:2mM, nPG:0,5mM. Ces tracés correspondent à une expérience représentative parmi plusieurs dizaines d'essai.

Fig 2.5:

Mise en évidence de l'activité PTOX: consommation d'oxygène de membranes bactériennes exprimant ou non PTOX, mesurée par oxygraphie. Les valeurs sont données en pourcentage de la consommation d'O₂ maximale (en absence d'inhibiteurs: 100%). Ces valeurs sont la moyennes de plus de 20 expériences indépendantes.



Ces expériences montrent que la présence de PTOX dans les membranes bactériennes est responsable d'une consommation d'oxygène insensible au KCN, mais sensible au nPG, inhibiteur connu de l'AOX. PTOX possède donc une fonction enzymatique similaire à celle de l'AOX, à savoir celle de quinol oxydase.

Cependant, dans ce test, cette activité attribuable à PTOX est dépendante de l'addition de PQ. Il est également notable que la consommation d'oxygène des membranes "contrôle" augmente avec l'addition de PQ. L'hypothèse la plus probable afin d'expliquer cette augmentation est que le système d'*E. coli* est capable de recruter cette plastoquinone dans son pool de quinone (généralement constitué d'ubiquinone), et que la taille de ce pool est un élément limitant dans la vitesse de transfert d'électrons au sein de la chaîne de transfert d'électrons. Ainsi, l'apport exogène de quinone disponible pourrait agrandir la taille du pool et permettre aux cytochromes une activité plus rapide.

On peut alors envisager deux hypothèses afin d'expliquer pourquoi cette activité PTOX est dépendante de l'apport de PQ exogène :

.. Tout comme l'AOX, PTOX pourrait nécessiter la présence d'un pool de quinone important et fortement réduit pour être activé (cf. introduction, §4.4). Ainsi, en augmentant le nombre de molécules de quinones réduites disponibles pour PTOX, l'addition de quinone exogène pourrait favoriser l'apparition de l'activité PTOX. On peut cependant supposer que suite à l'inhibition de l'activité des cytochromes par le KCN, la majeure fraction du pool d'ubiquinone bactérien se retrouve sous forme réduite. Il est alors fort peu probable que ce pool totalement réduit ne soit pas suffisant pour activer PTOX, si on considère que la quantité de quinone réduite et surtout la proportion de quinone réduite est le facteur majeur influençant l'activité de l'AOX.

.. La deuxième hypothèse est que l'activité de PTOX soit spécifiquement dépendante de la présence de PQ comme substrat. En effet, PTOX est localisée dans le chloroplaste et non dans la mitochondrie, comme l'est l'AOX. Or, la quinone utilisée dans les réactions de transfert d'électrons de la membrane thylacoïdienne est la plastoquinone, et non l'ubiquinone, substrat de l'AOX et présente dans les mitochondries et chez *E. coli*. Cette hypothèse explique également pourquoi la complémentation des bactéries déficientes en hème a été possible avec l'expression de l'AOX, mais pas avec celle de PTOX. PTOX et AOX ont des activités semblables, mais utiliseraient des substrats différents.

4) Mise en évidence du substrat de PTOX

Afin de définir une éventuelle spécificité de PTOX pour une quinone en particulier, plusieurs quinones, disponibles commercialement, ont été ajoutées dans des tests similaires à ceux décrits précédemment. La figure 2.6 présente les formules des quinones testées ici, à savoir la décyplastoquinone (PQ), la décyubiquinone (UQ), la benzoquinone (BQ), la duroquinone (DQ) et la vitamine K1 (VK1).

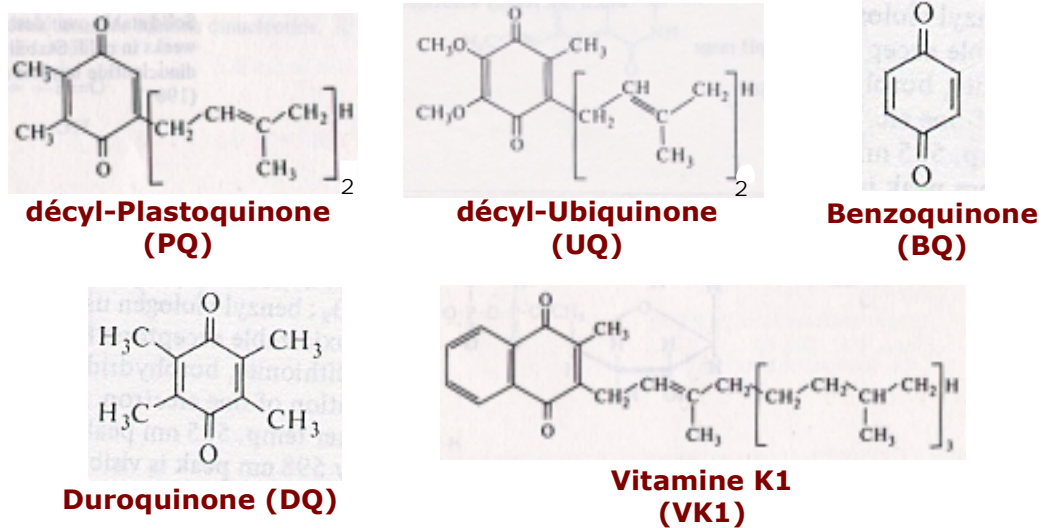


Fig 2.6: Formules des différentes quinones utilisées dans les essais résumés sur la fig 1.7.

Sur la fig 2.7 sont représentés les comportements de membranes exprimant ou non PTOX selon les quinones ajoutées dans l'essai. Il s'agit ici des valeurs brutes en nmoles d'O₂ consommé par min et par mg de protéines.

Plusieurs éléments sont notables:

.. En présence de la majorité des quinones testées, la consommation d'oxygène des bactéries augmente de façon non spécifique, en raison de l'apport exogène de quinones (fig 2.7-A et B). Seule la BQ n'augmente pas la consommation d'oxygène par rapport à des membranes respirant sur NADH seul, ce qui peut être le signe d'une incapacité de la BQ à pénétrer correctement dans les membranes bactériennes, du fait de sa faible hydrophobicité. Avec l'UQ, cette augmentation est très importante, signifiant que cette quinone est le substrat préférentiel des cytochromes d'*E. coli*.

.. Malgré une augmentation du pool de quinones disponible dans la membrane bactérienne dans la majorité des cas, seule l'addition de PQ permet d'observer une activité PTOX, correspondant à cette consommation d'oxygène résiduelle insensible au cyanure d'environ 20% (fig 2.7-B), consommation qui n'existe pas dans les membranes "contrôle" traitées dans les mêmes conditions (fig 2.7-A).

.. En présence de DQ, on peut voir une consommation résiduelle d'oxygène après addition de nPG d'environ 15%, ceci chez les membranes "contrôle" et les membranes PTOX (fig 2.7-A et 2.7-B): il semble donc y avoir ici une réaction chimique non spécifique entre la duroquinone et les membranes bactériennes.

La figure 2.7-C permet de comparer le comportement des membranes contenant PTOX et des membranes sauvages. Sur cet histogramme sont représentés les rapports entre les consommations d'oxygène de ces 2 types de membranes subissant les mêmes traitements. On voit ainsi une activité insensible au KCN en présence de PQ environ 7 fois plus importante dans les membranes possédant PTOX par rapport aux membranes "contrôle". Seule l'addition de PQ est capable de provoquer une telle activité.

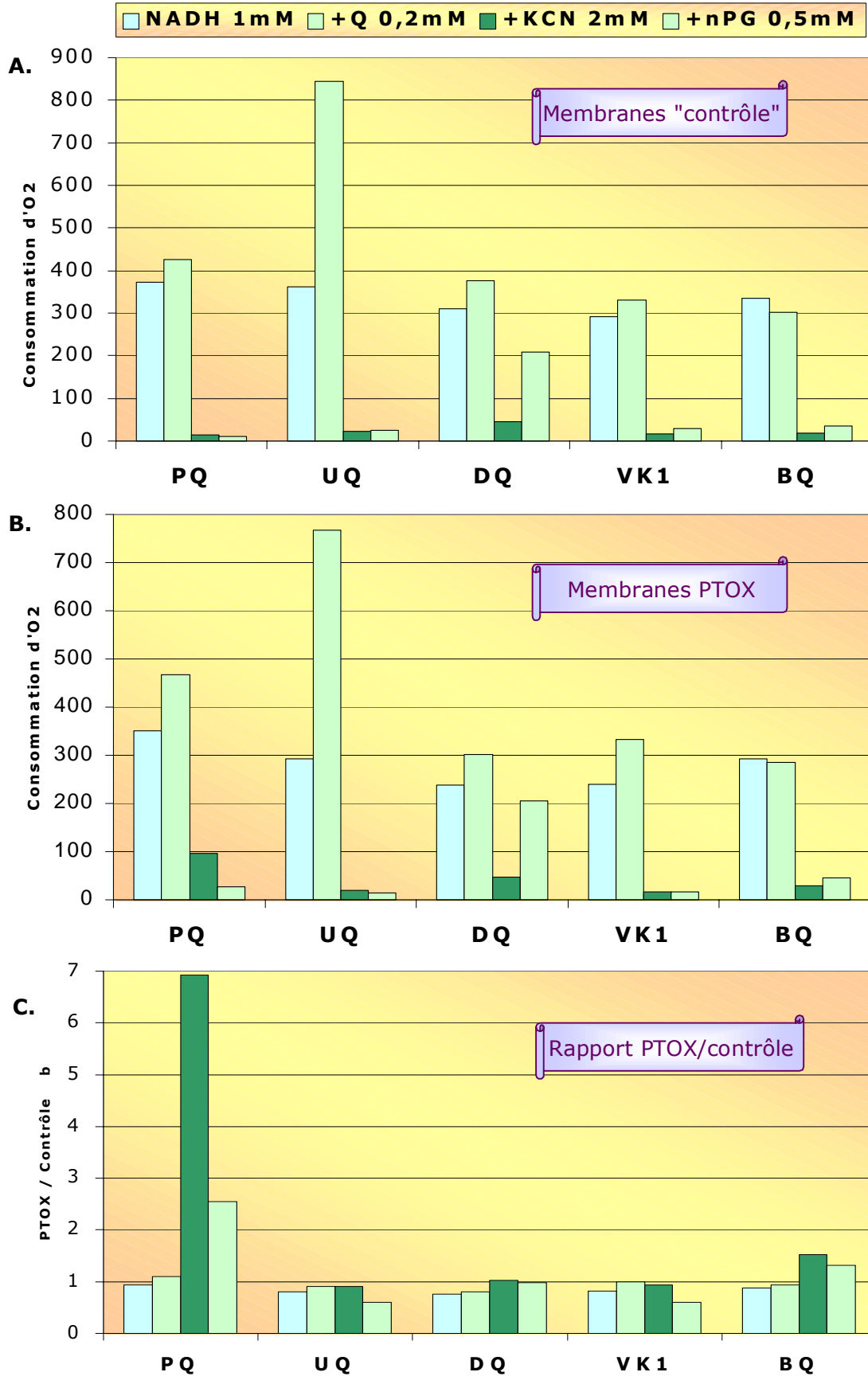


Fig. 2.7 Consommation d'oxygène des membranes bactériennes exprimant ou non PTOX selon l'apport de différents substrats, mesurée par oxygraphie. A: Membranes "contrôle" isolées à partir de bactéries sauvages. B: Membranes isolées à partir de bactéries exprimant PTOX. Pour A et B, la consommation d'oxygène est exprimée en nmoles d'O₂/min/mg de protéines. C: Rapport des consommations d'oxygène des 2 types de membranes.

L'activité PTOX est donc uniquement visible en présence de PQ, les autres quinones ne permettant pas une consommation d'oxygène insensible au cyanure. La PQ semble donc être le substrat spécifique et unique de PTOX. Celle-ci serait donc une plastoquinol – oxygène oxydoréductase.

Il est intéressant de mettre en relation ces résultats obtenus par oxygraphie sur l'activité enzymatique de PTOX avec les éléments de séquences et les modèles structuraux de l'AOX et de PTOX retrouvés dans la littérature. Ceci nous permet alors d'ébaucher une explication à la spécificité de PTOX pour la plastoquinone, et nous donne quelques renseignements sur la position du site de fixation à la quinone chez l'AOX et chez PTOX.

En effet, suite à l'étude d'un grand nombre de séquences correspondant à la poche de fixation de la tête polaire des quinones, Fisher et Rich ont défini un motif consensus pour la fixation des quinones : "aliphatique-(X)₃-H-(X)_{2/3}-(L/T/S)" (Fisher & Rich, 2000). Il semblerait que toutes les quinones reconnaissent ce site, avec des variations spécifiques à chaque type de quinone. Par exemple, la spécificité du site UQ est vraiment très prononcée car lorsqu'on compare la succinate déhydrogénase (SDH) et la fumarate déhydrogénase (FDH) de *E. coli*, qui sont 2 enzymes présentant une forte similitude de séquence et de structure quaternaire, on s'aperçoit alors que la SDH, dont le substrat est l'UQ, possède le site consensus A-(X)₃-H-(X)₂-S, site qu'on ne retrouve absolument pas chez la FDH, qui oxyde exclusivement le ménaquinol (Fisher & Rich, 2000 ; Prieur-Lavoué, 2002).

Il est intéressant de noter dans ce contexte que la NADH dH bactérienne est capable d'utiliser la PQ comme substrat, puisque l'addition de cette PQ sous forme oxydée aux membranes bactériennes provoque une augmentation de l'activité respiratoire, plus faible cependant qu'en présence d'UQ. Le site quinone de la NADH dH fixerait donc d'autres quinones comme la PQ, probablement de façon moins efficace. Ceci indique que malgré les spécificités de chaque site, il peut y avoir une reconnaissance (faible) d'un autre type de quinone : les motifs impliqués doivent être proches.

La figure 2.8 montre un alignement d'un grand nombre de séquences des 2 protéines AOX et PTOX, dans la région associée à la membrane, à proximité de la région LET (cf. fig 1.1). En se basant sur le consensus qu'ils ont dégagé, Fisher et Rich proposent dans leur article une région pour le site de fixation de l'UQ sur l'AOX (fig 2.8). Cependant, même si le consensus se retrouve dans cette région pour quelques séquences, essentiellement sur les AOX de plantes, on observe clairement qu'il n'est pas conservé quand on aligne une quantité importante de séquences, notamment celles d'AOX d'eucaryotes inférieurs. De plus, en comparant les séquences de l'AOX et de PTOX dans cette région, on ne retrouve absolument pas de motif similaire, même sous une forme dégénérée chez PTOX.

Par contre, il existe une zone appelée ici "site quinone alternatif", pour laquelle on voit clairement que l'AOX possède le consensus de fixation de l'UQ, à savoir : (G/A)-(X)₃-H-(X)₂-(T/S) (fig 2.8). PTOX, elle, présente un site assez proche mais néanmoins différent : (M/I)SVLH(M/L)YE(T/S), correspondant au consensus dégagé par Fisher & Rich sous la forme : (M/I)-(X)₃-H-(X)₃-(T/S). On remarque ici que le résidu H est systématiquement

conservé, et il semble qu'il forme une liaison hydrogène avec un des carbonyles de la tête polaire de la quinone.

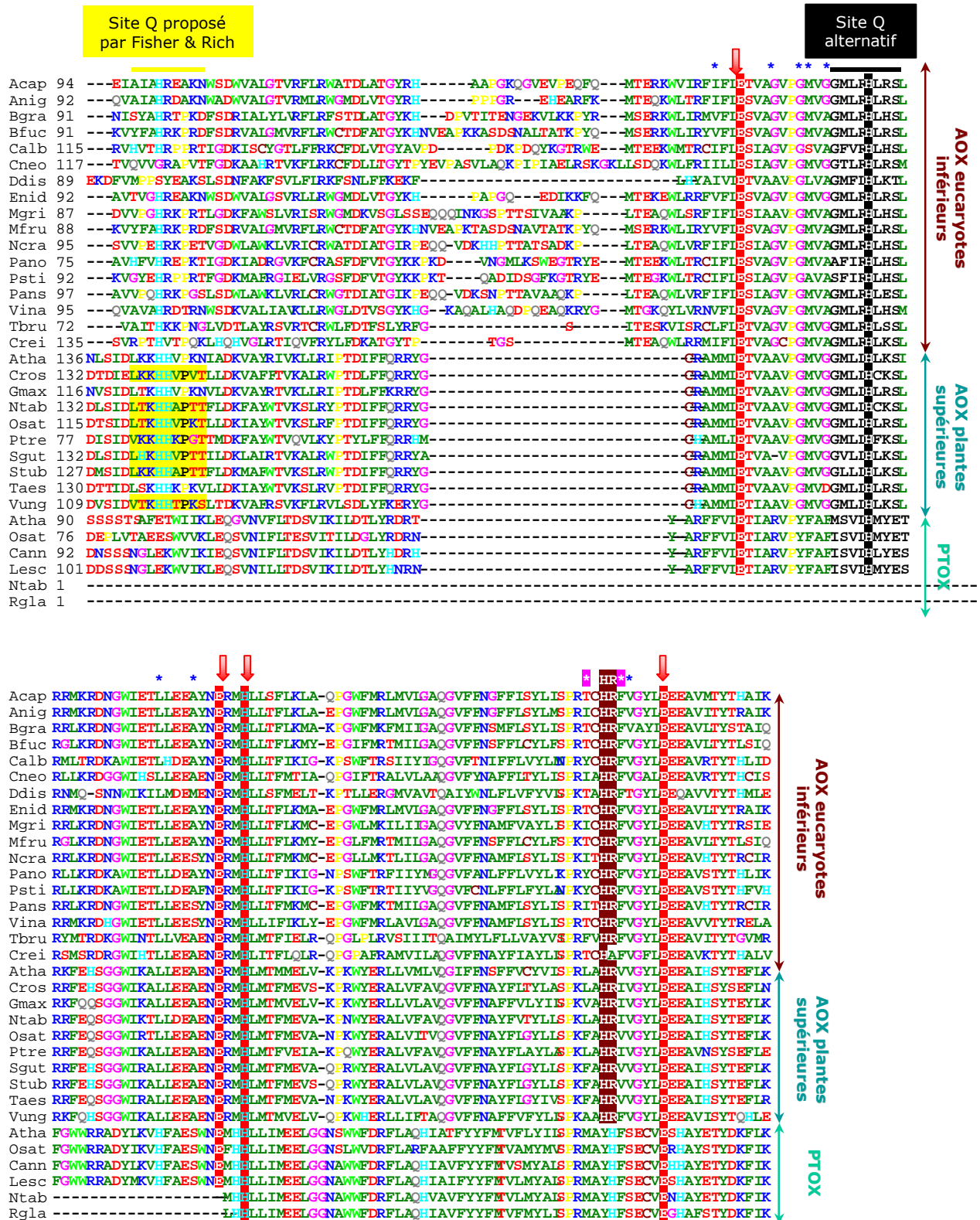


Fig 2.8: Alignement de quelques séquences d'AOX et de PTOX, dans la région du site quinone, cf. Matériels & Methodes §IV

Ce motif est censé fixer la tête polaire de la quinone : ceci suppose donc qu'il devrait être extra-membranaire, puisque c'est là qu'auraient lieu les échanges de protons avec la phase aqueuse afin de pouvoir oxyder (i.e. déprotomer) l'ubiquinol. Ce site quinone alternatif se situe entre les régions NERMHL et LET (cf. fig 2.1 et 2.2), et, d'après les modèles structuraux actuels, semble être extra-membranaire. De plus, il se situe à proximité immédiate de la région LET (cf. fig 2.1 et 2.2), qui fixe des atomes de fer, et également à proximité immédiate d'une poche hydrophobe (fig 2.8), déterminée d'après une forte homologie de séquence avec la $\Delta 9$ -desaturase, une autre oxydase à 2 fer du type R2, et qui est décrite comme fixant la partie hydrophobe de la quinone (Andersson & Nordlund, 1999). Le site décrit par Fisher et Rich est lui plus éloigné de ces différentes séquences, ce qui est particulièrement visible pour les AOX de champignons.

De façon intéressante, cette poche hydrophobe chevauche la paire HR (fig 2.8) identifiée comme étant le cœur d'une région faiblement homologue au site de fixation des quinones du cytochrome bactérien bc_1 (Fisher & Rich, 2000). Cette zone pourrait donc également être un candidat intéressant pour définir le site de fixation des quinones chez l'AOX (Affourtit *et al.*, 2002). Cependant, on note très clairement l'absence de cette paire dans les séquences de PTOX, qui présente les résidus YH au même endroit, suggérant ainsi que ces résidus HR retrouvés chez l'AOX pourraient ne pas être le site de fixation des quinones.

Jusqu'à présent, aucune donnée n'a permis de savoir si la fixation des 2 ubiquinols nécessaires au cycle enzymatique de l'AOX (Berthold *et al.*, 2000 ; cf. introduction, §4.2) arrivent de façon séquentielle sur le même site, ou arrivent sur 2 sites différents. Or, il n'existe pas d'autre région sur l'AOX présentant le motif consensus dégagé par Fisher et Rich, et nous avons vu qu'il est peu probable que le site qu'ils ont identifié soit réellement un site de fixation de la quinone : il semblerait donc que le cycle de catalyse de l'AOX implique une fixation séquentielle des substrats.

En acceptant le modèle que nous proposons, on alors peut considérer le motif (M/I)-(X)₃-H-(X)₃-(T/S) retrouvé chez toutes les PTOX comme étant le site de fixation de la tête polaire de la PQ. Il est dès lors intéressant de se pencher sur la structure des motifs retrouvés dans les différentes protéines étudiées ici et dans l'article de Fisher et Rich. En effet, de façon remarquable, toutes les protéines utilisant l'UQ présentent un résidu H espacé de 2 acides aminés par rapport aux résidus L, T ou S (partie droite du consensus), alors que chez PTOX, on ne retrouve plus un espacement de 2 mais de 3 acides aminés.

Sur la figure 2.9 est représenté un alignement de séquences des sous-unités de 49kDa du complexe I de la chaîne respiratoire (NuoD) et de la NAD(P)H dH plastidiale (NdhH). La NAD(P)H dH plastidiale (cf. introduction, §1.3.2) est une enzyme qui utilise et fixe la PQ. Cet alignement concerne la région homologue à la région fixant l'UQ chez NuoD (Dupuis *et al.*, 2001 ; Prieur *et al.*, 2001). Ici, clairement, le consensus de fixation de la quinone se retrouve sous une forme dégénéré, 2 formes étant envisageables : I/L/V-(X)₃-H-(X)₂-M ou I/L/V-(X)₃-H-(X)₃-E : c'est une fois de plus, comme chez PTOX, la partie droite du motif qui varie avec ici une absence des résidus consensuels L, T ou S.

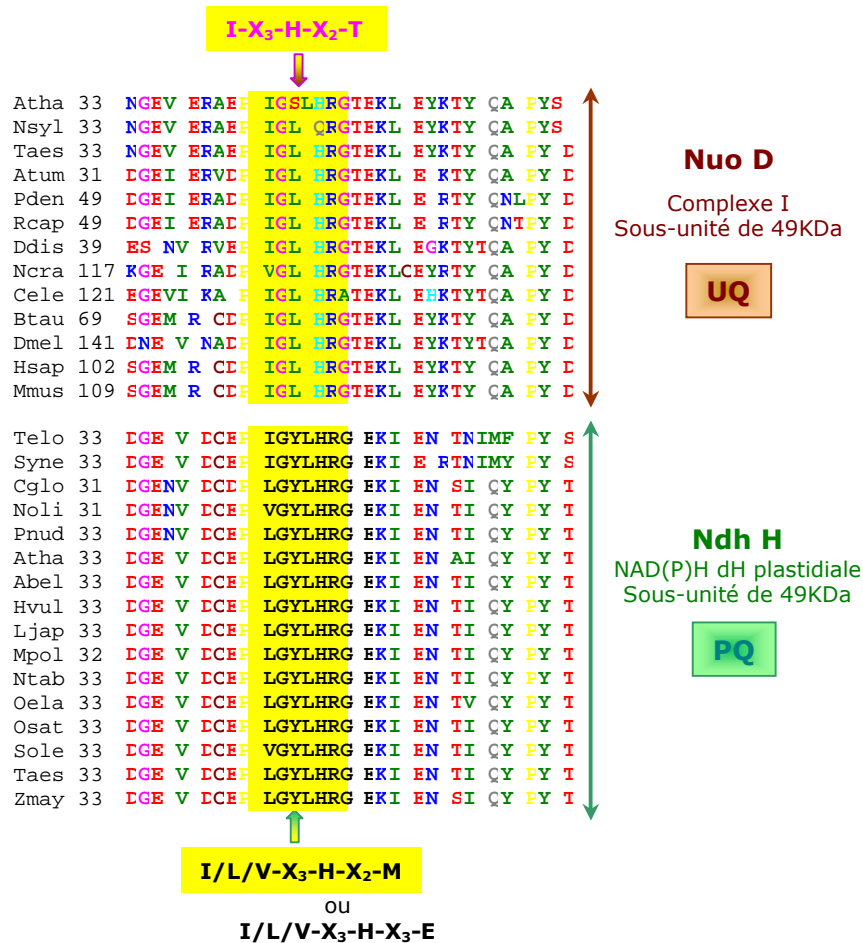


Fig 2.9: Alignement d'extraits de quelques séquences des sous-unités de 49kDa du Complexe I (mitochondrial ou bactérien) et de la NAD(P)H dH plastidiale, dans la région du site de fixation de la quinone. cf. Matériels & Methodes §IV

Des études de mutagenèse sur l'une de ces protéines seraient ici indispensables pour déterminer si cette partie du motif pourrait être la caractéristique de la fixation de la PQ. PTOX serait alors une cible adéquate pour ces expériences, du fait de son caractère facultatif pour la survie de la plante sous certaines conditions.

5) Test des inhibiteurs de l'AOX

Dans les essais précédents, le nPG, inhibiteur de l'AOX, a été utilisé avec succès afin d'inhiber l'activité PTOX. La figure 2.10 présente la structure du nPG et du SHAM, tous les 2 connus pour inhiber l'AOX de façon compétitive, en empêchant la fixation de son substrat (Siedow & Girvin, 1980 ; Siedow & Bickett, 1981).

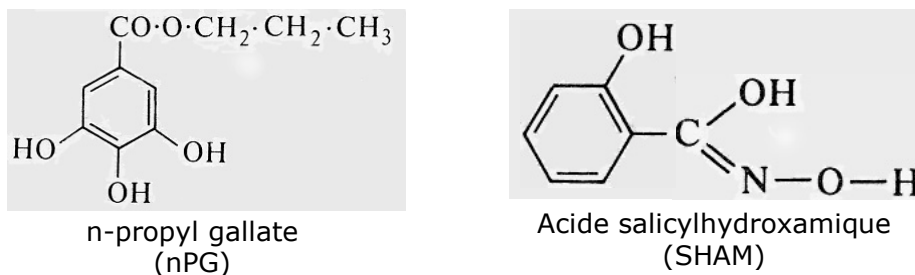


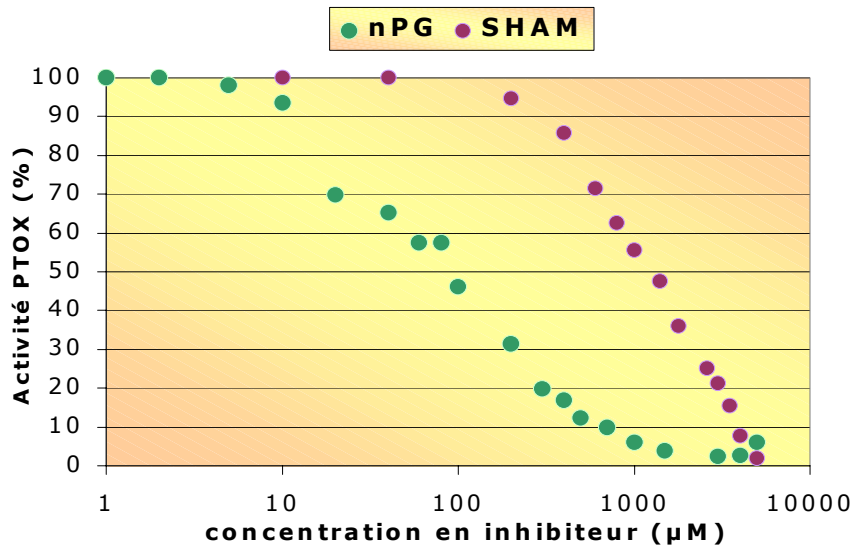
Fig 2.10: Structures du nPG et du SHAM, inhibiteurs de l'AOX et de PTOX.

Le nPG n'inhibe pas la respiration d'*E. coli*, alors qu'1mM de SHAM inhibe de 30% l'activité du cytochrome bo (Berthold, 1998). De ce fait, dans ce type de système expérimental utilisant des membranes bactériennes, le SHAM n'est pas un inhibiteur spécifique des oxydases du type AOX. Nous avons donc préférentiellement utilisé le nPG dans nos expériences. Néanmoins, puisque notre système suppose une inactivation des cytochromes par le KCN, il a été possible de mesurer l'effet du SHAM sur PTOX dans des conditions où son effet sur le cytochrome bo était négligeable puisque ce dernier n'est pas actif.

La fig 2.11 compare l'effet du nPG et du SHAM sur l'activité PTOX. PTOX est sensible à ces 2 inhibiteurs, mais à des concentrations différentes, et notre système a un I₅₀ pour le nPG de 80µM contre un I₅₀ pour le SHAM d'environ 1,3mM. Les membranes contenant PTOX présentent donc une sensibilité différentielle à ces 2 inhibiteurs, avec une sensibilité au SHAM relativement faible.

Fig 2.11:

Effet de 2 inhibiteurs, le nPG et le SHAM, sur l'activité de PTOX, mesurée par oxygraphie sur des membranes isolées à partir de bactéries exprimant PTOX. Pourcentage de l'activité de PTOX en fonction de la concentration en inhibiteur.



Ces valeurs de I₅₀ sont très élevées si on les compare aux résultats retrouvés dans la littérature dans le cas de l'AOX : lorsque l'AOX est exprimée chez *E. coli*, on retrouve un I₅₀ pour le SHAM de 40µM, et pour le nPG de 390nM (Berthold, 1998). Dans le cas d'expériences effectuées sur des mitochondries purifiées à partir d'hypocotyle de d'haricot mungo (*Vigna aureus*), on a un I₅₀ pour le SHAM de 60µM et pour le nPG de 4µM (Schonbaum *et al.*, 1971 in Berthold, 1998 ; Siedow.& Girvin, 1980), et enfin dans des mitochondries purifiées de symplocarpe fétide (*Symplocarpus foetidus*), on observe un I₅₀ pour le SHAM de 260µM (Schonbaum *et al.*, 1971 in Berthold, 1998). Nos résultats nous permettent donc d'observer des valeurs de 5 à 30 fois plus importantes pour le SHAM, et de 20 à 200 fois plus importantes pour le nPG. Il est ici néanmoins important d'insister sur le fait que ces mesures ont été obtenues dans des systèmes expérimentaux tous très différents, ce qui peut en partie expliquer de tels écarts entre ces résultats. Cependant, il est possible que l'AOX et PTOX présentent des caractéristiques biochimiques différentes vis-à-vis de ces 2 inhibiteurs. On peut d'ailleurs noter que

quelque soit le système, on remarque systématiquement une sensibilité plus forte au nPG qu'au SHAM.

Une mutagenèse de l'AOX d'*Arabidopsis* exprimée chez *E. coli* par Berthold a permis d'obtenir des mutants de cette enzyme résistants au SHAM (Berthold, 1998). De façon intéressante, ces mutations n'ont aucun effet sur la résistance de l'AOX au nPG : les sites de fixation de ces 2 inhibiteurs doivent être différents. Ceci pourrait également expliquer la sensibilité différentielle au nPG et au SHAM retrouvée chez PTOX.

La comparaison des séquences de l'AOX et de PTOX nous donne quelques éléments d'interprétation de ces résultats. En effet, sur la figure 2.2 sont indiqués les sites mutés dans cette étude : on retrouve 2 mutations un peu en amont de la région LEEEA, et la troisième dans la région C terminale.

On peut facilement voir ici que les résidus mutés de la région LEEEA, s'ils ne sont pas exactement conservés entre l'AOX et PTOX, sont malgré tout de même nature (tous sont des acides aminés aliphatiques). Par contre, la région C terminale est très divergente entre les 2 protéines, et l'acide aminé muté dans l'étude de Berthold n'existe pas chez PTOX. Or, cette mutation dans la région C terminale est celle qui a l'effet le plus important sur l'acquisition de la résistance (Berthold, 1998). Ainsi, une sensibilité faible au SHAM chez PTOX peut s'expliquer par une différence de structure dans la région C-terminale de la protéine.

Chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, un flux d'électrons entre le PSII et l'O₂ a été attribué à un homologue de PTOX, ceci suite à la mise en évidence de similitudes biochimiques et immunologiques entre le système observé chez l'algue et notre système expérimental (Cournac *et al.*, 2000 ; cf. chap 3). Contrairement à ce que nous avons observé en exprimant la protéine d'*A. thaliana* dans une bactérie, le flux vers l'O₂ dans les thylacoïdes de *C. reinhardtii* est totalement insensible au SHAM, même à des concentrations supérieures à 2mM. Il est alors probable que l'oxydase de *C. reinhardtii*, tout en partageant avec les PTOX de plantes supérieures une homologie suffisante permettant une réaction croisée d'un anticorps dirigé contre la protéine d'*A. thaliana* (Cournac *et al.*, 2000), soit différente des PTOX de plantes supérieures, une hypothèse étant notamment une différence significative au niveau des sites discutés dans l'étude de Berthold.

La récente obtention d'une séquence d'une quinol-oxygène oxydoréductase à destinée chloroplastique chez *C. reinhardtii* (AF494290) a permis de mettre en évidence des différences effectives de séquence entre cette PTOX et celles de plantes supérieures. La figure 2.12 présente un alignement de quelques séquences de PTOX. On voit ici que les sites essentiels à la fonction de la protéine sont conservés : les sites de fixation du fer et le site défini ici comme fixant la plastoquinone se retrouvent chez PTOX de *C. reinhardtii*. L'un des 2 résidus discutés précédemment et défini comme étant déterminants dans la fixation du SHAM par Berthold est inchangé, le second change légèrement : une leucine remplace une méthionine, changement qu'on retrouve parmi les AOX également (cf. fig 2.8). Ainsi, une mutation au niveau de ces sites ne semble pas être la cause de la résistance au SHAM de la protéine de *C. reinhardtii*.

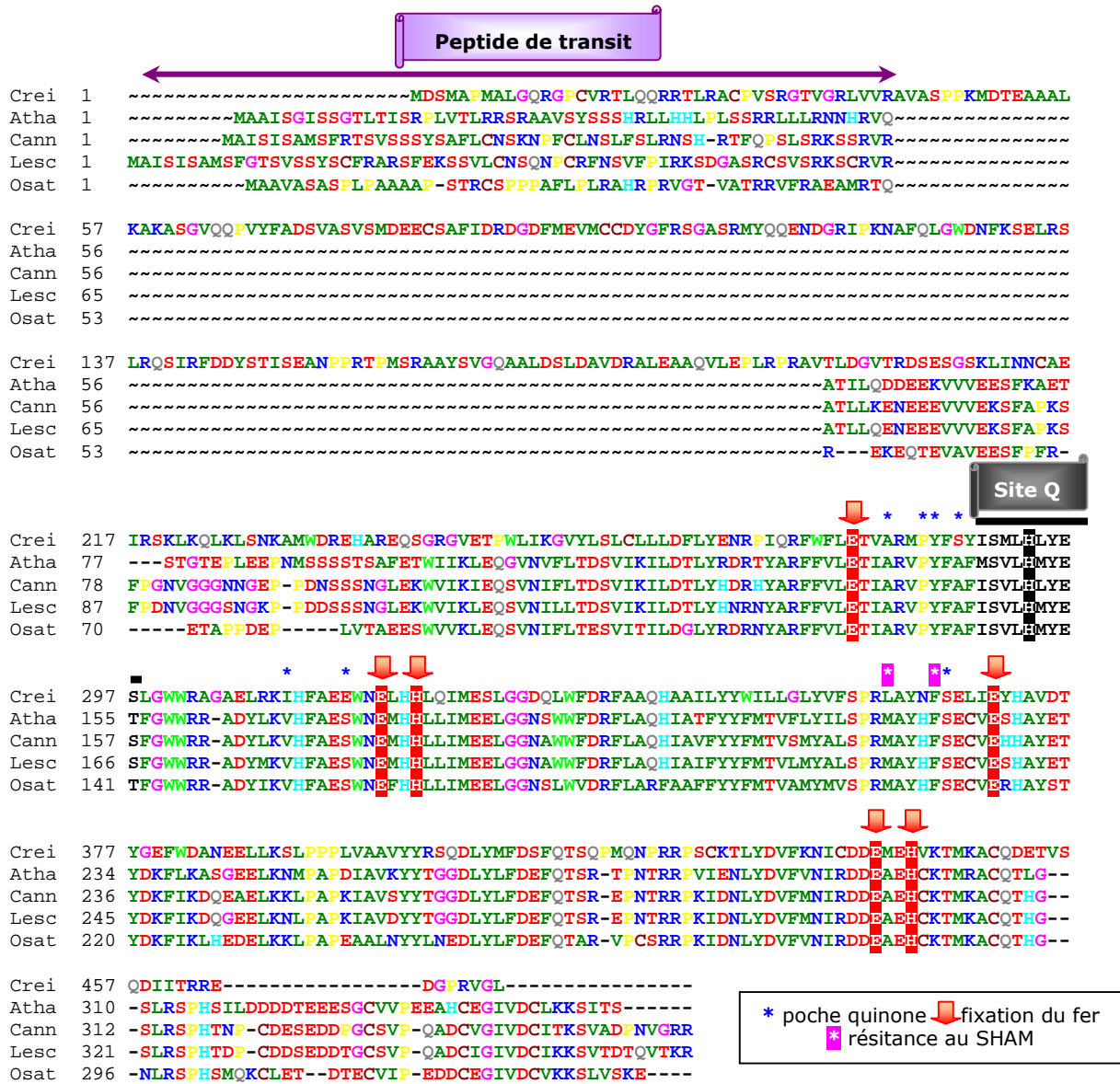


Fig 2.12: Alignement d'extraits de quelques de PTOX de plantes supérieures et de *Chlamydomonas reinhardtii*. On peut voir qu'il existe une longue séquence N-terminale chez l'algue qu'on ne retrouve pas chez les plantes supérieures. cf. Matériels & Methodes §IV

Une différence de séquence est cependant frappante sur cet alignement (fig 2.12) : la partie N-terminale de la protéine de l'algue est particulièrement longue. Après avoir déterminé la limite du peptide de transit grâce au programme de prédiction ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>), on peut voir ici que PTOX de *C. reinhardtii* possède une partie N terminale de plus de 150 acides aminés dont la séquence ne correspond à rien de connu parmi les séquences disponibles dans les bases de données accessibles. Il est ainsi possible que cet élément de la protéine change de façon plus ou moins importante sa conformation, ou du moins l'accessibilité du site catalytique au SHAM. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de comparer la sensibilité au SHAM de la protéine entière et de la protéine tronquée (sans ces 150 acides aminés N-terminaux) après production dans notre système bactérien.

Puisque le SHAM semble être un inhibiteur compétitif pour l'AOX et qu'il est un analogue des quinones, il a été proposé que les sites mutés dans l'étude de Berthold au niveau de la région LEEEA soient impliqués dans la fixation de la quinone (Andersson & Nordlund, 1999 ; Berthold 1998, Berthold *et al.*, 2000). Il est malgré tout peu probable, compte tenu de ce que nous avons vu précédemment, que ces sites soient directement impliqués dans la liaison de la molécule de quinone. Ceci d'autant plus que ces sites sont absents de PTOX, et que la sensibilité de PTOX au SHAM est faible. Néanmoins, il est possible que ces mutations conduisent à un changement dans la structure de la protéine à proximité de la région de fixation de la quinone, conduisant à une modification de l'accessibilité au site de liaison.

6) Importance du pH dans l'activité PTOX

Dans le chloroplaste, à la lumière, le lumen du thylacoïde s'acidifie, alors que le stroma s'alcalinise. Ceci est dû à une entrée de protons dans le lumen du thylacoïde, conséquence de la mise en route de la chaîne de transfert d'électrons de la photosynthèse (cf. introduction, §1.2). De nombreuses enzymes du chloroplaste sont régulées par la lumière via ce changement de pH des différents compartiments chloroplastiques. Nous avons précédemment vu l'exemple de la violaxanthine dé-époxydase, enzyme luminale participant au cycle des xanthophylles, activée par une acidification du lumen (cf. introduction, §1.3.2).

Aussi était-il intéressant d'analyser le comportement de PTOX selon le pH. La figure 2.13-A montre le comportement de membranes bactériennes à différents pH. Il s'agit ici des valeurs brutes en nmoles d'O₂ par min et par mg de protéines.

On peut voir ici plusieurs éléments :

.. Entre pH 6,0 et pH 8,5, les membranes d'*E.coli* ont une activité optimale. A partir de pH plus extrêmes, c'est-à-dire à partir et en dessous d'un pH 5,5 et à partir et au-dessus d'un pH 9,0, l'activité respiratoire des membranes bactériennes chute de plus de la moitié de sa valeur maximale.

.. A pH 9,0, l'addition de nPG au milieu réactionnel provoque une consommation d'O₂ importante (environ 100 nmol/min/mg de protéines). Cette tendance est également visible à partir d'un pH 8,5. Il est possible qu'on assiste là à une réaction d'auto-oxydation du nPG provoquée par un pH élevé ou par une interaction avec le tampon glycine-NaOH utilisé dans ces 2 conditions expérimentales.

Le comportement des membranes isolées à partir de bactéries exprimant PTOX est rapporté sur la figure 2.13-B. Elle montre une augmentation de l'activité PTOX à pH alcalin : celle-ci est quasiment multipliée par 2 entre un pH 6,0 et un pH 9,0. Là encore, le nPG provoque une réaction non spécifique avec le milieu d'électrode à des pH alcalins, ne permettant pas de mettre en évidence l'inhibition de l'activité PTOX habituellement observée à pH plus bas.

Ce résultat se retrouve confirmé sur la figure 2.13-C qui représente le rapport des activités de consommation d'O₂ des membranes PTOX et "contrôle". Elle montre clairement une optimisation de l'activité de PTOX pour des pH plus alcalin : d'un rapport

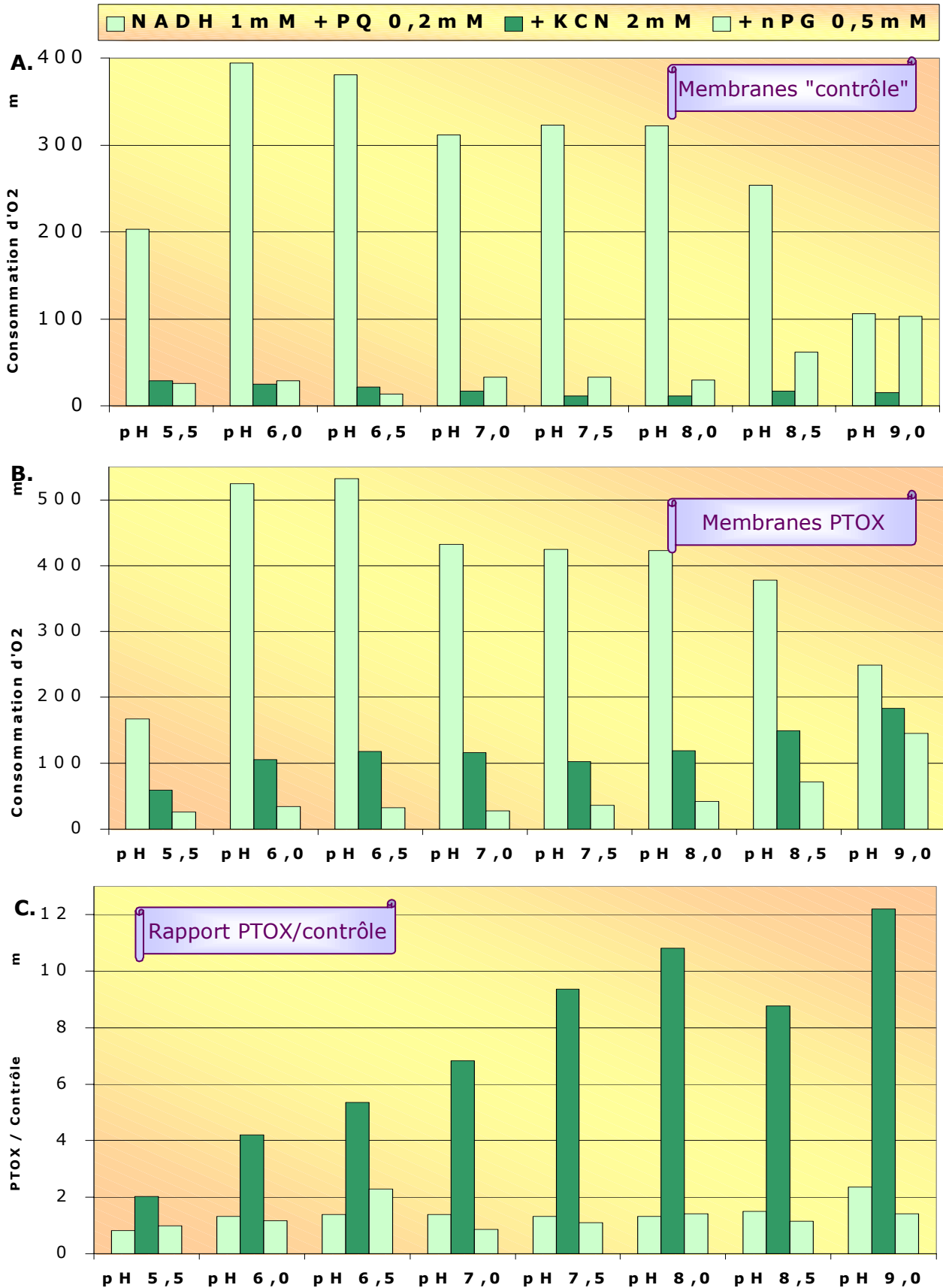


Fig 2.13: Consommation d'oxygène mesurée par oxygraphie des membranes bactériennes exprimant ou non PTOX selon le pH de l'essai. Pour obtenir ces différents pH, plusieurs tampons ont été utilisés: pH 5,5 à 8,0: KH₂PO₄ 50mM, pH 6,0 à 8,0: Tris-Maléate 50mM, pH 8,5 à 9,0, Glycine-NaOH 50mM. A: Membranes "contrôle" isolées à partir de bactéries sauvages. B: Membranes isolées à partir de bactéries exprimant PTOX. Pour A et B, la consommation d'oxygène est exprimée en nmol d'O₂/min/mg de protéines. C: Rapport des consommations d'oxygène des 2 types de membranes.

PTOX/contrôle égal à 4 à pH 6,0, on atteint un rapport égal à 12 à pH 9,0 : PTOX est donc plus active à pH alcalin.

Plusieurs questions surgissent à l'énoncé de ce résultat. Tout d'abord, quel est le pH physiologiquement retrouvé dans le plaste ? On estime qu'à la lumière, le pH du lumen peut descendre jusqu'à 5,5, celui du stroma ne montant pas à plus de 8,0, alors qu'à l'obscurité, les 2 compartiments s'équilibrent à un pH autour de 7,0 (Werdan *et al.*, 1975 *in* Buchanan, 1980) . Cependant, des variations locales plus importantes et difficilement mesurables ont probablement lieu à proximité de la membrane thylacoïdienne. Ainsi l'ATP synthase pourrait être activée par un gradient de protons localisé dans une zone tampon de séquestration de protons (Ewy & Dilley, 2000). Dans ces conditions, un pH local égal à 9,0 à proximité de la face stromatique de la membrane thylacoïdienne est tout à fait envisageable, et, dans cette hypothèse, le comportement de PTOX à un tel pH peut permettre de discuter de sa localisation au sein du plaste.

En effet, certaines données montrent que PTOX n'est pas transmembranaire, mais fortement liée à la membrane (cf. chapitre 1, §4.2). Il serait alors intéressant de savoir si PTOX est luminale ou stromatique. Soit PTOX est une enzyme luminale, qui est active à pH alcalin : ceci signifie donc qu'elle n'est pas activée à la lumière, condition sous laquelle le lumen s'acidifie, soit PTOX est une enzyme du stroma. Dans ce cas, son activation à pH alcalin pourrait correspondre physiologiquement à une activation par la lumière dans la plante. La tendance qui se dégage de cette expérience montrant une plus forte activité de PTOX à un pH clairement très élevé (en tout cas plus élevé que le pH atteint par le lumen durant la nuit) favorise cette seconde hypothèse. Il est intéressant dans ce contexte de voir dans la suite de cette étude que dans la plante, PTOX semble être régulée par la lumière, aussi bien au niveau de sa production que de son activité (cf. chapitre 4). On peut donc en conclure que PTOX est plus active à pH alcalin, phénomène pouvant traduire physiologiquement une activation à la lumière de l'enzyme située dans le stroma.

D'autre part, jusqu'à présent, aucune expérience n'a permis de déterminer l'orientation de l'AOX. Il semblerait cependant que l'AOX soit une protéine située dans la matrice mitochondriale et non dans l'espace inter-membranaire : étant activée par le pyruvate et par réduction du pont di-sulfure reliant les 2 parties du dimère (cf. introduction, §4.4) ceci par interaction au niveau d'un résidu de cystéine N-terminal (cf. §9 et fig 2.18), il est nécessaire que le pyruvate et les réductants solubles (thioredoxine ou glutathion) puissent avoir accès à la protéine (Berthold *et al.*, 2000), ce qui n'est possible que dans la matrice. PTOX ne semble pas posséder ce type de régulation (cf. § 9), mais, par homologie, on peut faire l'hypothèse qu'elle possède une orientation stromatique, correspondant à l'orientation matricielle de l'AOX. (Affourtit *et al.*, 2002 ; Berthold *et al.*, 2000).

7) Température optimale de l'activité PTOX

Afin de caractériser de façon plus complète PTOX, et également afin d'ébaucher quelques hypothèses sur ses rôles dans la physiologie de la plante, sur lesquels nous

reviendrons dans les chapitres suivants et notamment au chapitre 4, il nous a paru intéressant d'analyser le comportement de PTOX à différentes températures.

Ainsi, nous avons effectué le même type d'essai que précédemment dans une palette de températures allant de 15°C à 40°C, ce qui correspond à l'éventail de températures les plus adaptées à la majorité des plantes (à basse altitude et climat tempéré).

La figure 2.14 donne les consommations d'oxygène de notre système à ces différentes températures. On observe que les membranes d'*E. coli* ont une activité respiratoire bien plus importante à des températures assez élevées : la consommation d'oxygène est multiplié par plus de 5 entre 15°C et 40°C (fig 2.14-A et 2.14-B) . Cela traduit tout simplement le fait qu'*E. coli* a une température optimale de croissance autour de 37°C, et il est alors naturel que son système enzymatique respiratoire soit très actif à cette température.

Ceci montre néanmoins l'une des limites du test que nous utilisons ici : en effet, de nombreuses plantes vivent à des températures inférieures à 15°C, mais il nous est impossible de tester l'activité de PTOX à une température inférieure à 15°C avec ce test, puisque les membranes d'*E. coli* n'ont alors quasiment plus d'activité détectable.

Si l'activité des membranes bactériennes augmente avec la température, on peut observer sur la figure 2.14-B que l'activité résistante au cyanure due à PTOX augmente également, mais de façon beaucoup plus modérée. Cependant, si on cherche à comparer correctement ces valeurs, en normalisant les consommations d'oxygène les unes par rapport aux autres, et ceci en prenant comme référence 100% pour la consommation d'oxygène des membranes en présence des seuls substrats, et donc en l'absence d'inhibiteurs (fig 2.14-C), on peut alors voir qu'il y a finalement peu de différence d'activité de PTOX selon les différentes températures testées, avec même une tendance à la baisse pour les températures les plus hautes.

En résumé, il semble donc, d'après ces résultats, que l'activité des enzymes de la membrane bactérienne augmente avec la température, alors que celle de PTOX paraît globalement constante. Ceci est surprenant, car on aurait pu s'attendre à une augmentation conjointe : en effet, lorsque la NADH DH du colibacille est plus active, elle produit plus de PQ réduite, qui ne peut pas être réoxydée par les cytochromes, puisqu'ils sont inhibés par le cyanure : le pool de PQ réduite disponible pour PTOX doit alors être important. Si PTOX, à l'instar de l'AOX, était beaucoup plus active en présence d'un pool de Q réduit plus important (cf. introduction, § 4.4), ces conditions devraient être favorables à une activité plus importante de PTOX. Ce n'est apparemment pas le cas ici : la température pourrait donc jouer un rôle sur l'activité de PTOX, celle-ci pouvant être active à des températures relativement faibles.

Cette donnée est vraiment intéressante si on la replace dans le contexte du rôle physiologique majeur de l'AOX : être une valve de sécurité. Il se pourrait alors que PTOX possède le même type de fonction : en effet, au froid et en lumière élevée, la photosynthèse n'est pas optimale, car il y a production d'un grand nombre de métabolites phosphorylés, et de ce fait, la disponibilité des trioses phosphates pour la RUBISCO s'abaisse, provoquant une baisse de l'assimilation du CO₂, et donc une accumulation d'énergie au niveau de la chaîne de transfert d'électrons qui se retrouve

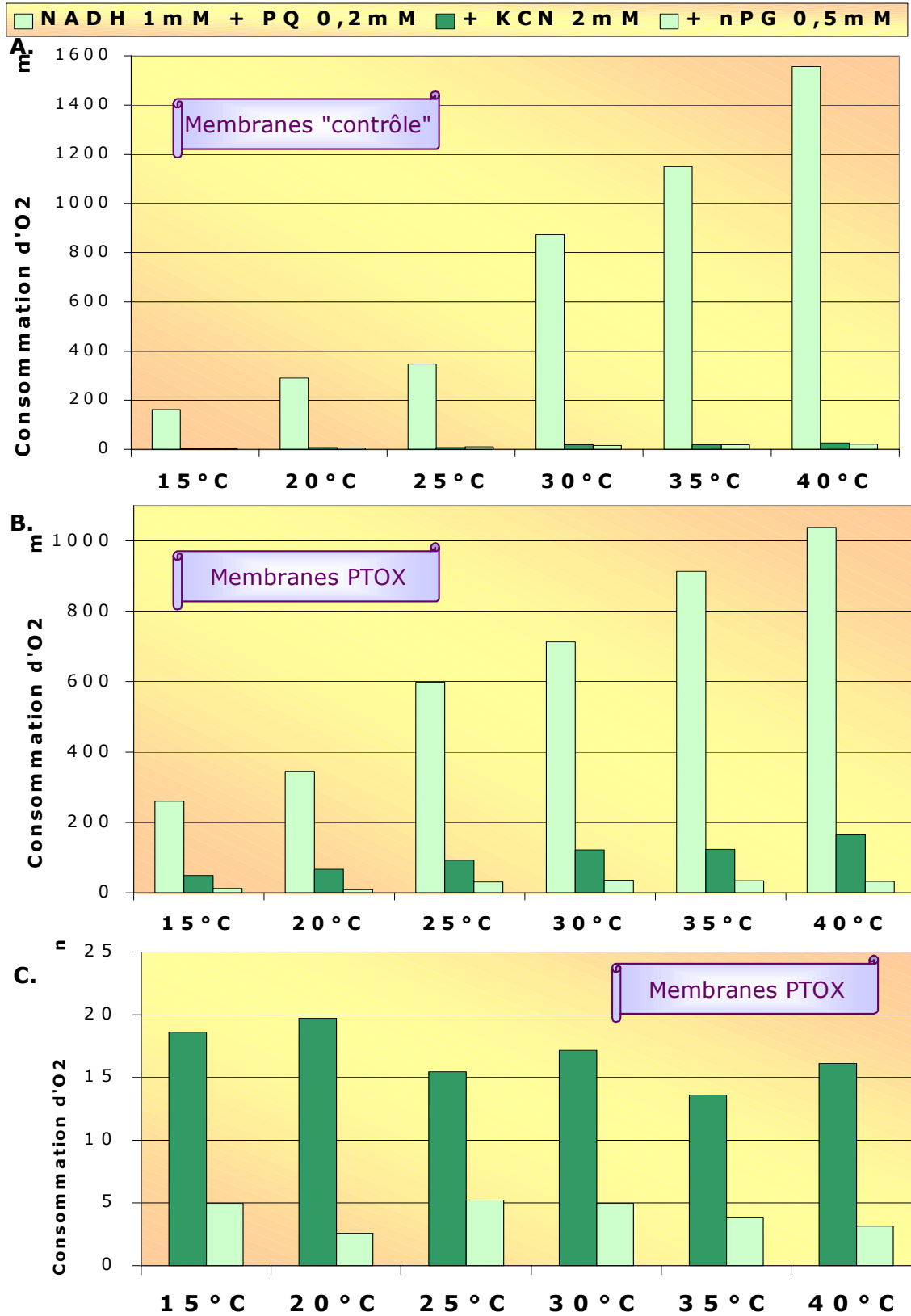


Fig 2.14: Consommation d'oxygène des membranes bactériennes exprimant ou non PTOX au cours d'essais à différentes températures, mesurée par oxygraphie. A: Membranes "contrôle" isolées à partir de bactéries sauvages. B: Membranes isolées à partir de bactéries exprimant PTOX. Pour A et B, la consommation d'oxygène est exprimée en nmoles d'O₂/min/mg de protéines. C: Les résultats représentés en B sont ici normalisés par rapport à la consommation maximale d'O₂ (en absence d'inhibiteurs, la consommation d'O₂ correspond à 100%). Ceci permet de rapporter l'activité PTOX à l'activité des membranes bactériennes, dont les fluctuations sont importantes selon les différentes températures testées.

saturée (Allen & Ort, 2001). C'est alors qu'il y a production de ROS, et la plante subit un stress oxydant important (cf. introduction, § 1.2.3). PTOX pourrait alors agir dans ces conditions et permettre une réoxydation du pool de PQ, réoxydation qui ne peut plus être assurée par le cytochrome b6/f, alors saturé : en gaspillant de l'énergie, PTOX pourrait alors servir de valve de sécurité.

8) Métaux cofacteurs de PTOX

Sur l'AOX, ainsi que sur PTOX, le modèle actuel définit 4 régions possédant des motifs et des résidus susceptibles de fixer 2 atomes de fer (fig 2.1). Suite à des homologies de séquences entre l'AOX et les protéines à 2 fer de type R2, il a été proposé que le mécanisme enzymatique de l'AOX implique un centre à Fer-Fer (cf. introduction, §4.2). Lorsque l'AOX du trypanosome est exprimée chez *E. coli*, l'addition d'orthophénantroline (OP) au milieu de culture, provoquant une chélation des ions divalents, inhibe l'activité de l'AOX, alors que cette activité est restaurée si l'on complémente cette culture par du FeSO₄ (Ajayi *et al.*, 2002). Jusqu'à présent, aucune preuve expérimentale n'a confirmé la présence de fer comme co-facteur de l'activité de PTOX, et c'est pourquoi il nous est apparu intéressant de vérifier l'importance de l'impact de la présence de fer pour cette protéine.

Nous avons donc réalisé le même type de mesures d'oxygraphie que précédemment, ceci sur des membranes bactériennes isolées à partir de cultures ayant subi des traitements de chélation puis de complémentation avec différents métaux. A cette fin, nous avons utilisé l'OP, chélateur des cations divalents, afin d'appauvrir nos cultures en fer ou en tout autre métal susceptible d'être co-facteur de PTOX, puis nous avons complémenteés ces cultures avec différents métaux : le FeSO₄, le ZnSO₄, le CuSO₄ ou le MnSO₄. La concentration en OP utilisée ici est de 50µM, celle des sulfates de métaux de 125µM (Ajayi *et al.*, 2002).

La figure 2.15 présente le comportement respiratoire des membranes bactériennes selon les traitements subis pendant la culture.

Plusieurs éléments notables se dégagent ici :

.. L'ajout d'OP dans la culture d'*E. coli* ralentit de façon dramatique la croissance bactérienne (non montré), signe que la chélation des cations divalents a bien lieu et n'est pas sans conséquence sur le métabolisme bactérien. Néanmoins, les membranes "contrôle" provenant de cultures traitées à l'OP présentent une activité respiratoire équivalente à l'activité des membranes "contrôle" cultivées en conditions optimales : il est très possible que le traitement utilisé ici chélate les cations divalents libres dans le milieu, empêchant la formation de nouvelles protéines contenant des cofacteurs métalliques, et donc la multiplication bactérienne, mais les cofacteurs déjà présents dans les protéines nécessitant des cations divalents - dont les protéines de la chaîne respiratoire - ne sont pas délogés de leurs emplacements. Le but de ce traitement est d'empêcher le cofacteur éventuel de PTOX de s'intégrer dans la protéine, afin d'obtenir une PTOX non fonctionnelle. Puisque cet OP est ajouté aux cultures au moment de l'induction de la synthèse de PTOX dans les bactéries l'exprimant, il ne sera alors pas possible d'introduire ce/ces cofacteur(s) dans les protéines d'intérêt synthétisées. On a

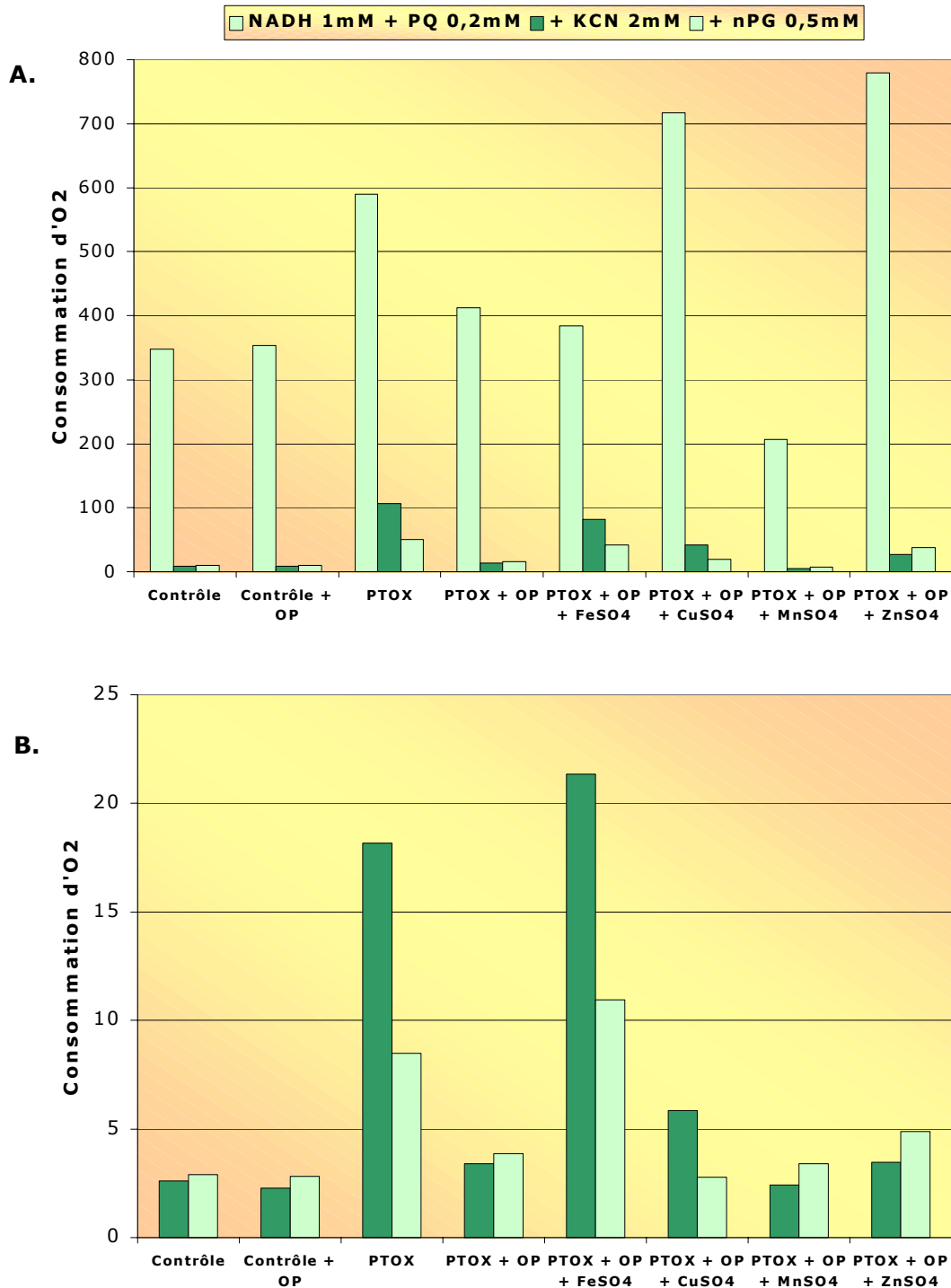


Fig 2.15: Test de l'incidence de la présence de différents métaux sur l'activité de PTOX: consommation d'oxygène de membranes bactériennes purifiées à partir de bactéries exprimant ou non PTOX, cultivées en présence de différents métaux, mesurée par oxygraphie. Les bactéries sont cultivées dans du milieu LB additionné ou non selon les cas d'OP (50µM), de FeSO₄, CuSO₄, MnSO₄ ou ZnSO₄ (125µM). A: Consommation d'oxygène en nmoles d'O₂/min/mg de protéines. B: Les résultats représentés en A sont ici normalisés par rapport à la consommation maximale d'O₂ (en absence d'inhibiteurs), afin de compenser les fluctuations des activités respiratoires des membranes préparées à partir de cultures bactériennes différentes.

donc ici un système tout à fait satisfaisant, puisque la chaîne respiratoire d'*E. coli* fonctionne, permettant une mesure oxygraphique, et PTOX ne pourra pas intégrer de cations divalents comme co-facteurs.

.. On observe une très forte fluctuation dans les activités respiratoires des différentes membranes testées ici. On peut voir notamment que l'activité des membranes issues de cultures supplémentées en Cu ou en Zn est supérieure aux autres activités, et que celle des membranes purifiées à partir de cultures supplémentées en Mn est assez faible (fig 2.15-A). Ceci peut refléter d'une part l'état physiologique des bactéries cultivées en présence de différents métaux, mais également la qualité de la préparation des membranes bactériennes, qui varie d'une purification à une autre. Ces fluctuations pourraient gêner l'interprétation des résultats, ceci en augmentant de façon artificielle la consommation d'O₂ des membranes bactériennes en présence de KCN. Ainsi, la figure 2.15-B permet de normaliser ces différences : ici sont présentées l'activité respiratoire des membranes en présence de KCN puis de nPG après normalisation à 100% d'activité en absence d'inhibiteurs.

.. Les figures 2.15-A et 2.15-B montrent que l'ajout d'OP dans la culture d'*E. coli* inhibe totalement l'activité PTOX : un cation divalent est donc effectivement nécessaire à cette activité. Seule une complémentation de la culture bactérienne par FeSO₄ permet de retrouver une activité PTOX comparable à l'activité mesurée en conditions de culture optimale (fig 2.15-B). L'addition de MnSO₄ et de ZnSO₄ ne permettent pas de restaurer une activité PTOX, alors qu'il semble que la présence de CuSO₄ permette une faible activité PTOX (fig 2.15-B). Il est possible que cette faible activité soit liée à un déplacement de l'équilibre de la chélation, l'OP liant le Cu²⁺ étant alors susceptible de relarguer du Fe²⁺.

Ainsi, ces résultats indiquent que la présence de Fe²⁺ est indispensable à la restauration d'une activité de PTOX optimale, et que Cu²⁺, Zn²⁺ et Mn²⁺ ne sont pas capables de permettre une activité PTOX correcte.

Nous nous sommes alors posé la question suivante : cette chute d'activité en absence de Fe²⁺ est-elle due à une absence de synthèse de PTOX en absence de son cofacteur ? Ou bien la protéine est-elle synthétisée mais elle n'est pas fonctionnelle ?

La figure 2.16 montre le résultat d'un SDS-PAGE et d'un western blot réalisés sur les protéines isolées à partir des cultures utilisées pour préparer les membranes bactériennes lors des expériences précédentes. La coloration du gel au bleu de Coomassie ainsi que l'immunorévélation par un anticorps dirigé contre l'étiquette histidine que possède notre protéine recombinante indiquent qu'approximativement la même quantité de PTOX est synthétisée, quelque soit le traitement réalisé sur les cultures. Il semble qu'un peu moins de PTOX soit détectable en présence de MnSO₄ ou de ZnSO₄, mais la quantité de protéine recombinante produite ici par la bactérie est malgré tout importante et devrait suffire à permettre la visualisation de l'activité PTOX si cette dernière était fonctionnelle.

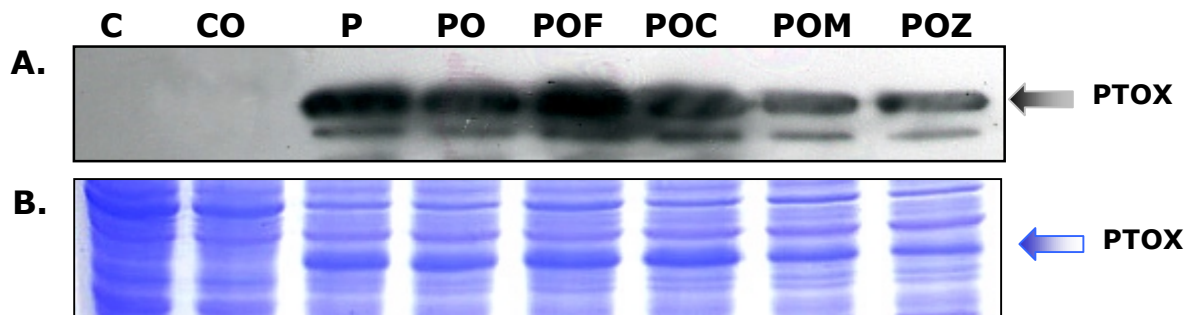


Fig 2.16: Contrôle de la synthèse de PTOX par les bactéries selon les conditions de culture. SDS-PAGE de protéines extraites à partir de différentes cultures d'E.coli. A: immunodétection avec un anticorps anti-his au 1/5000°. B: coloration du gel au bleu de Coomassie. C: membranes "contrôle", CO: "contrôle" traitées à l'OP, P: membranes "PTOX", PO: "PTOX" traitées à l'OP, POF: "PTOX"+OP et additionnées de $FeSO_4$, POC: "PTOX"+OP + $CuSO_4$, POM: "PTOX"+ OP+ $MnSO_4$, POZ: "PTOX"+ OP+ $ZnSO_4$

La figure 2.17 montre le même type d'immunorévélation sur des protéines isolées directement sur les membranes utilisées dans cette expérience. On y voit que PTOX est présente dans les membranes, et ce même en absence de Fe^{2+} . Ainsi, PTOX est synthétisée et s'insère dans les membranes même en l'absence de son cofacteur.

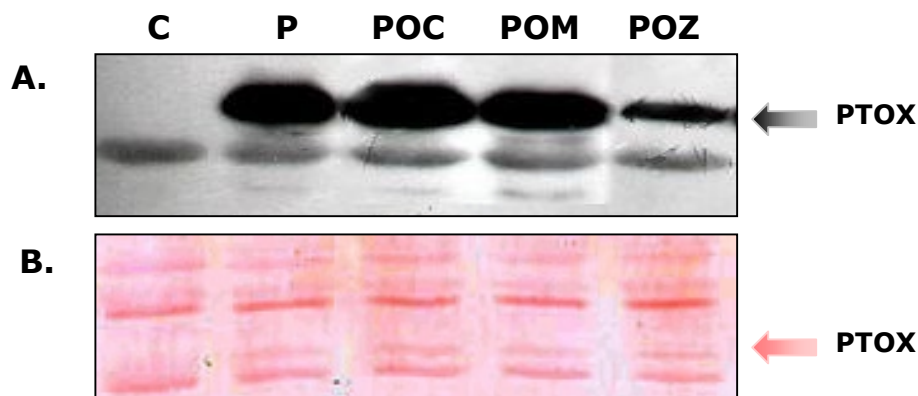


Fig 2.17: Contrôle de l'intégration de PTOX dans les membranes bactériennes. SDS-PAGE de protéines extraites à partir de membranes utilisées dans les essais d'oxygraphie. A: immunodétection avec un anticorps anti-his au 1/5000°. B: coloration de la membrane au rouge Ponceau. C: membranes "contrôle", P: membranes "PTOX", POC: "PTOX"+OP + $CuSO_4$, POM: "PTOX"+ OP+ $MnSO_4$, POZ: "PTOX"+ OP+ $ZnSO_4$

Il est donc clair que Fe^{2+} n'est pas nécessaire à la synthèse mais bien à l'activité PTOX.

Cette expérience permet donc de confirmer les modèles actuels de l'AOX et de PTOX, qui ont prédit la présence de 2 atomes de Fe au sein de ces protéines. Ceci apporte donc un argument supplémentaire pour confirmer le mécanisme de catalyse de la réaction d'oxydation du quinol par ces protéines (cf. introduction, §4.2).

9) Effet du pyruvate sur l'activité PTOX

Même si la réalité de la régulation de l'AOX par le pyruvate est remise en question *in vivo* (Millenaar *et al.*, 1998 ; Siedow & Umbach, 2000), il est un fait qu'*in vitro*, l'activité

de l'AOX augmente en présence de pyruvate, et d'un α -céto acide en général (Day *et al.*, 1994 ; Umbach *et al.*, 1994, cf introduction, §4.4). Cette régulation ne peut d'ailleurs pas être dissociée d'une régulation redox de cette protéine, capable de se dimériser par la formation d'un pont di-sulfure entre 2 résidus de cystéine situés en position N terminale sur la protéine (Umbach & Siedow 1993, cf. introduction, §4.4).

Etant donné les similarités entre PTOX et l'AOX, nous avons voulu tester la possibilité que PTOX soit également régulée par le pyruvate.

Umbach et ses collaborateurs ont montré que 5 mM de pyruvate est capable d'augmenter d'un facteur 3 l'activité de l'AOX exprimée chez *E. coli* dans des membranes isolées en absence de DTT (dans lesquelles l'AOX est sous forme moins active, dimérisée), et d'un facteur 5 l'activité de l'AOX dans des membranes isolées en présence de DTT (avec une AOX monomérique activée) (Umbach *et al.*, 2002)

Aussi avons nous effectué le même type d'expérience que précédemment, en ajoutant à notre mélange réactionnel de 1 à 8mM de pyruvate. Aucune effet n'a pu être détecté (non montré). Il semblerait donc que PTOX ne soit pas activable par le pyruvate, contrairement à l'AOX.

Ce résultat est en accord avec l'analyse des différentes séquences dont nous disposons. Tout d'abord, il a été montré que le résidu de cystéine responsable de l'activation de l'AOX par le pyruvate (et de sa dimérisation), est la cystéine conservée la plus N-terminale (Siedow & Umbach, 2000 ; cf fig 2.1). D'autre part, seules les AOX retrouvées chez les plantes supérieures sont capables de dimérisation : les AOX retrouvées dans les champignons et les mitochondries de certains protozoaires se retrouvent sous forme monomérique (Siedow & Umbach, 2000 ; Umbach & Siedow, 2000), et ne sont pas sensibles aux activations décrites pour les AOX de plantes, à savoir une régulation par l'état redox et par les α -céto acides.(Umbach & Siedow, 2000). Il est alors intéressant de remarquer que seules les AOX de plantes possèdent la C N-terminale dont nous parlions précédemment (fig 2.18). Les séquences d'AOX provenant de champignons montrent qu'il n'y a aucune C conservée dans cette région, et il en est de même pour les séquences de PTOX : ceci peut donc expliquer l'absence d'effet du pyruvate sur PTOX. Cela ne signifie par contre pas que PTOX n'existe que sous la forme d'un monomère, car il existe d'autres résidus potentiellement capables de permettre une multimérisation de PTOX.

Le pyruvate n'étant pas un métabolite clef des processus plastidiaux, nous avons également testé la possibilité d'une régulation de PTOX par d'autres molécules : le 3-phospho glycérate, dérivé des trioses phosphate, qui est une molécule clef de plusieurs voies métaboliques, puisqu'il est capable de réguler 2 enzymes, l'ADPglucose pyrophosphorylase et la fructose-6-phosphate 2 kinase, ainsi que le glycéraldéhyde-3-phosphate, un triose phosphate, précurseur des caroténoïdes. Les résultats avec ces 2 molécules se sont avérés négatifs : aucun des 2 ne semble avoir un effet sur l'activité PTOX. Il serait néanmoins intéressant de trouver un régulateur métabolique de PTOX, et d'autres candidats pourraient être testés, comme par exemple le malate et l'oxalo-acétate, qui sont des "molécules-navettes" entre la mitochondrie et le plaste.

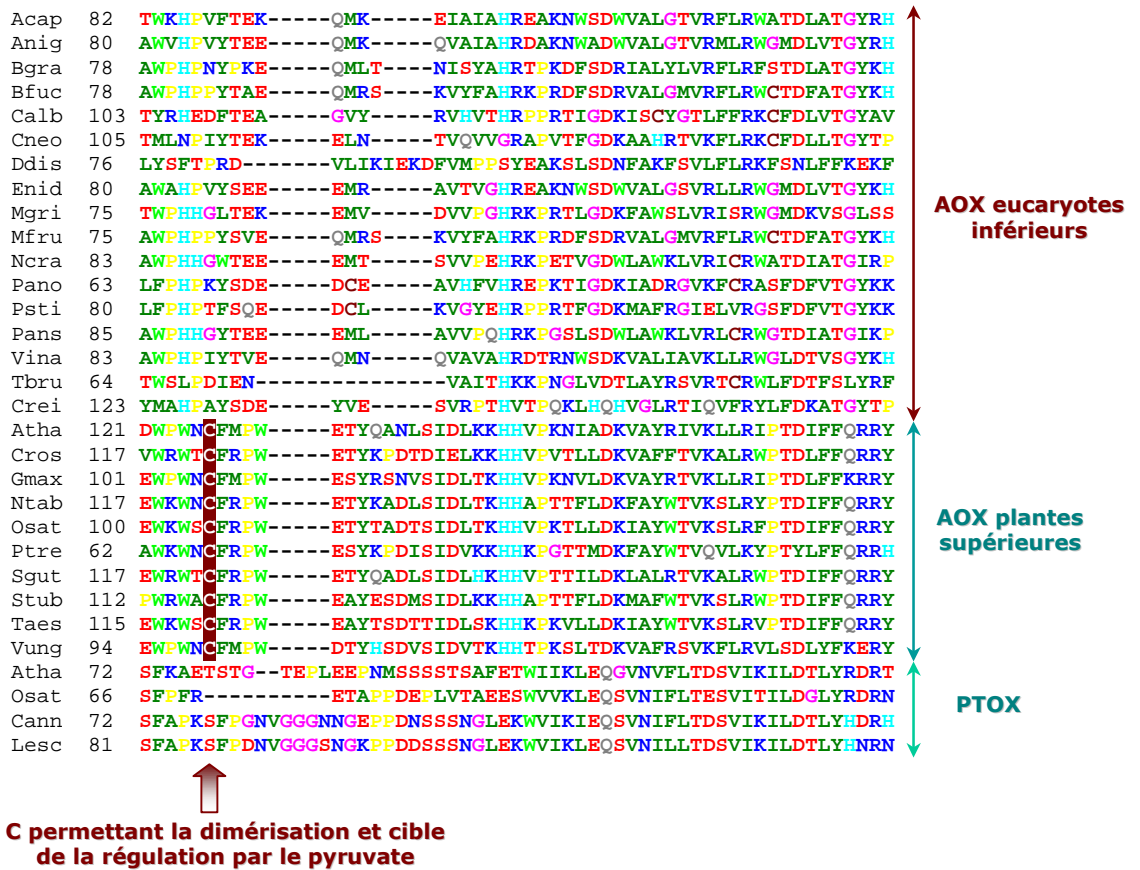


Fig 2.18: Alignement de quelques séquences d’AOX et de PTOX dans la région possédant le résidu de cystéine, cible de régulation et permettant la dimérisation de l’AOX des plantes supérieures. cf. Matériels & Methodes §IV

10) Recherche de régulateurs redox de l’activité PTOX

La présence de DTT au cours de la préparation des mitochondries isolées ou de membranes bactériennes contenant l’AOX provoque une augmentation de l’activité de cette enzyme. Ceci semble être dû à la capacité de régulation de l’AOX par sa dimérisation, qui dépend de l’état rédox d’un résidu C N-terminal (cf. Introduction §4.4).

PTOX ne possède pas cette C, et il n’a pas été possible de déterminer avec certitude si cette protéine est capable de multimérisation. Cependant, sa fonction enzymatique et son rôle potentiel dans la régulation du flux d’électrons dans la membrane du thylacoïde en font une cible idéale pour des régulations d’ordre rédox. C’est ce que nous avons voulu tester.

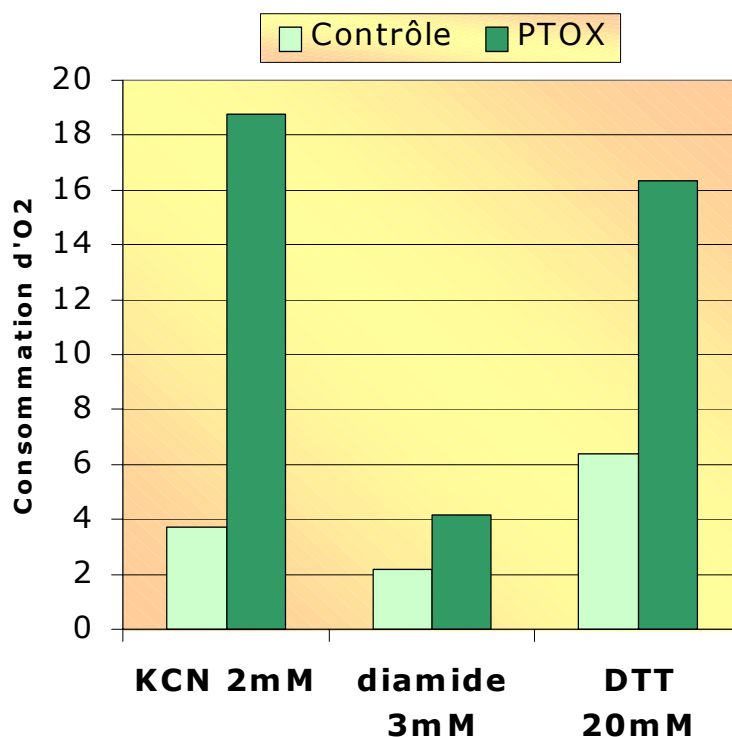
Nous avons donc effectué le même type d’expérience que précédemment, en ajoutant du DTT ou de la diamide à notre milieu réactionnel. La figure 2.19 représente les résultats que nous avons obtenus, sur des membranes contenant PTOX ou non. Les valeurs ont ici été normalisées sur la quantité maximale d’activité respiratoire des membranes bactériennes, ce qui signifie que la consommation d’O₂ en absence d’inhibiteurs est égale à 100%.

On voit ici qu’en présence de KCN, dans les membranes contenant PTOX, il reste un peu moins de 20% d’activité respiratoire, ce qui correspond aux valeurs observées jusqu’à

présent. L'ajout de diamide fait chuter cette valeur de façon importante. L'ajout de DTT restaure une activité respiratoire à peu près équivalente au niveau précédent.

Fig 2.19:

Test de l'incidence de composés rédox sur l'activité de PTOX: consommation d'oxygène de membranes bactériennes purifiées à partir de bactéries exprimant ou non PTOX. Les valeurs sont données en pourcentage de la consommation d'O₂ maximale (en absence d'inhibiteurs: 100%).
Concentrations utilisées: KCN 2mM, diamide 3mM, DTT 20mM.



En parallèle, la même expérience pratiquée sur des membranes "contrôle" montre le même comportement de ce système. En effet, suite à l'addition de KCN, la consommation d'oxygène de ces membranes est presque largement diminuée, mais pas complètement inhibée, ce que nous avons jusqu'à présent systématiquement observé dans toutes nos expériences. Ceci est certainement dû à un reste d'activité des cytochromes qu'on n'arrive pas à inhiber complètement. Il est remarquable de noter qu'en présence de diamide, cette activité résiduelle très faible se retrouve malgré tout diminuée, et qu'elle augmente à nouveau en présence de DTT : ces 2 molécules ont donc un effet sur le système respiratoire d'*E. coli*, et ce indépendamment de la présence de PTOX.

Ainsi, il est difficile d'interpréter les valeurs obtenues sur les membranes possédant PTOX : la chute d'activité en présence de diamide est-elle due partiellement/entièrement à une chute d'activité de la NADH dH ? Ou encore de l'activité résiduelle des cytochromes, qui ne doivent pas être totalement inhibés ? De même pour l'effet du DTT : a-t-on une restauration de l'activité car la NADH dH est activée par le DTT, ou est-ce strictement imputable à PTOX ? La complexité du système que nous utilisons ici, et surtout l'intervention d'un grand nombre de partenaires protéiques tous susceptibles d'être modulés par des facteurs rédox empêche de donner une réponse à ces questions.

La solution idéale pour connaître le comportement de PTOX face à ce type de molécules serait de mettre au point un test n'utilisant plus ces membranes d'*E. coli*. On pourrait par exemple imaginer l'introduction de la protéine purifiée de façon non dénaturante à partir de la surproduction par *E. coli*, dans des micelles lipidiques. Il serait alors envisageable d'ajouter à ce système une diaphorase, et de reprendre le même principe de test utilisant

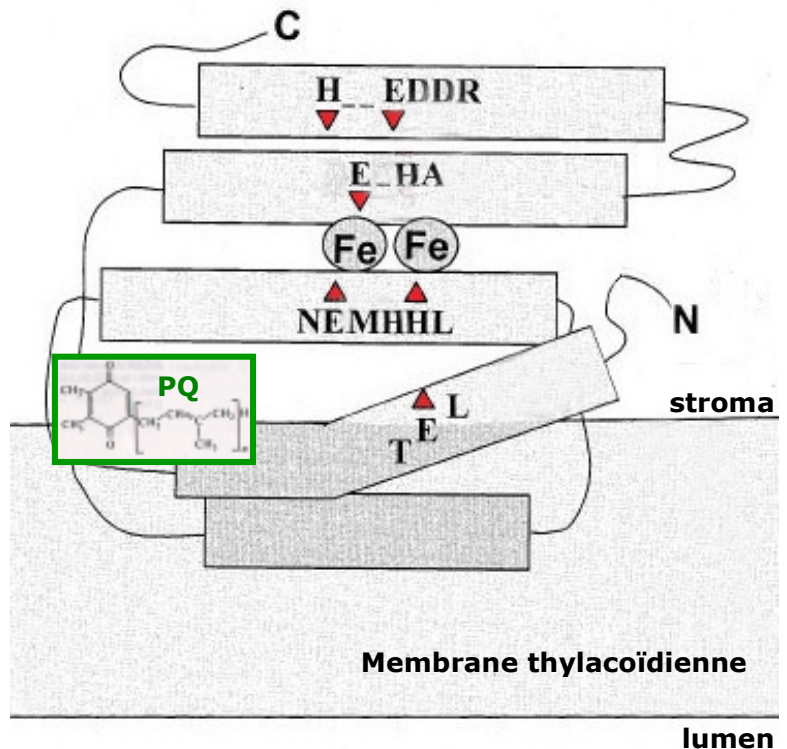
le NADH pour substrat. Ceci permettrait de se débarrasser des incertitudes liées à la présence de l'activité résiduelle et difficilement inhibée des cytochromes de la bactérie. On aurait d'ailleurs également pu imaginer utiliser la souche d'*E. coli* SASX41B dépourvue de cytochromes. Ceci pose cependant quelques problèmes liés au fait que, tant que la PQ n'est pas rajoutée dans le système, PTOX n'assure pas la complémentation de l'activité respiratoire, et, si l'on ajoute l'acide aminolévulinique dans la culture, alors la bactérie fabriquera des cytochromes : il s'agit donc d'une impasse. De toute façon, ces 2 systèmes ajouteraient un partenaire protéique susceptible de nous empêcher d'interpréter correctement les résultats, que ce soit la diaphorase ou la NADH DH bactérienne. Il serait donc plus judicieux d'arriver à fournir de la PQ réduite à PTOX : ainsi nous n'observerions plus que le comportement de notre protéine. Le développement d'un tel test permettrait également de tester l'effet d'une grande quantité de molécules sur l'activité de PTOX, et pourquoi pas de rechercher des inhibiteurs de cette protéine, qui pourraient à terme devenir des herbicides compétitifs : le développement de ce genre de test est donc une des pistes futures de développement de ce travail, et c'est une perspective particulièrement intéressante.

CONCLUSION

Ces différentes données obtenues sur l'activité de PTOX et calquées sur les recherches antérieures sur l'AOX nous ont donc permis de démontrer l'activité de notre protéine, ainsi que certains de ses modes de régulation. Sa structure hypothétique est représentée sur la figure 2.20, et on retrouve ici les sites universellement conservés de fixation du fer, le site de fixation de la plastoquinone, et l'orientation supposée de la protéine sur la membrane thylacoïdienne, d'après l'évolution de l'activité de PTOX selon le pH de l'expérience.

Fig 2.20:

Schéma de la structure de PTOX (adapté de Berthold et al., 2000). Les triangles rouges correspondent aux sites prédits de fixation du fer, le site de fixation de la plastoquinone se situe à l'interface entre la membrane thylacoïdienne et le stroma du plaste, et la région N-terminale est différente de la région N-terminale de l'AOX.



Il est alors intéressant de se questionner sur le (ou les ?) rôle physiologique de PTOX.

D'une part, nous avons vu que le mutant d'*Arabidopsis thaliana immutans* – et c'est également le cas du mutant de tomate *ghost-* dépourvu de PTOX accumule du phytoène et est bloqué dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes : PTOX semble donc avoir un rôle dans cette voie de biosynthèse.

De plus, nous avons vu que PTOX est localisé dans la membrane thylacoïdienne, c'est-à-dire en connexion avec la chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse. Il est alors fort possible qu'elle interagisse réellement avec ces transferts d'électrons, autorisant des transferts alternatifs d'électrons, et pouvant de ce fait être impliquée dans des mécanismes de "valves de sécurité" (cf. introduction, §1.3.2) lors de la lutte contre le stress, ainsi que dans le phénomène de chlororespiration.

CHAPITRE 3 :
RÔLE DE PTOX *IN VIVO* DANS LA
BIOSYNTHÈSE DES CAROTÉNOÏDES ET LA
CHLORORESPIRATION

CHAPITRE 3 :

ROLE DE PTOX *IN VIVO* DANS LA BIOSYNTHÈSE DES CAROTÉNOÏDES ET LA CHLORORESPIRATION

RESULTATS & DISCUSSION

1) PTOX dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes

D'une part le mutant *immutans* accumule du phytoène, précurseur de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (cf. introduction, § 3). D'autre part, nous avons vu au chapitre 1 (§ 4.3) que PTOX s'accumule dans les membranes chromoplastiques. Finalement, on observe une augmentation du transcrit *ptox* ainsi que de la quantité de protéine au cours de la maturation du fruit chez la tomate (Josse *et al.*, 2000 ; Simkin, 2002). Ces données indiquent fortement une implication de PTOX dans la biosynthèse des caroténoïdes, notamment au cours de la maturation du fruit de tomate, ce que nous avons voulu confirmer ici.

1.1) Le mutant de tomate *ghost*

Le mutant de tomate *ghost*, mutant momogénique et accessible au "Tomato Genetic Stock Center, University of California", sous le numéro LA0259, accumule du phytoène dans ses fruits (Mackinney *et al.*, 1956; Scolnik *et al.*, 1987) Il présente des feuilles panachées accumulant des secteurs blancs à la lumière. Ses fleurs ne sont pas colorées, ses fruits immatures demeurent blancs, et les fruits matures prennent une coloration jaune due à la présence de flavonoïdes (fig. 3.1). Malgré l'absence de désaturation des caroténoïdes, les fruits du mutant *ghost* présentent d'autres symptômes de maturation tel que le ramollissement du fruit par exemple

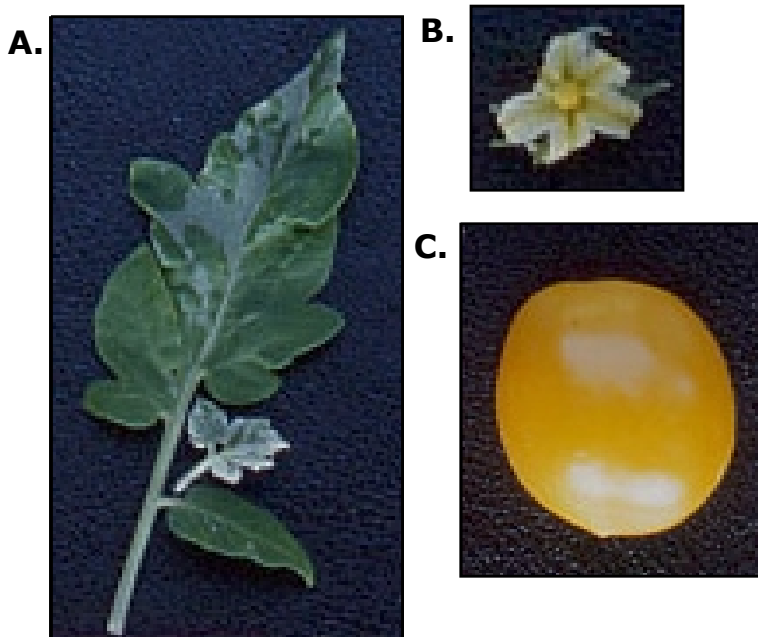


Fig 4.1:

Phénotype du mutant de tomate *ghost*. A: Feuilles panachées comprenant des secteurs blancs plus étendus en présence de lumière. B: Fleurs n'accumulant pas de caroténoïdes colorés. C: Fruit mature incapable d'accumuler du lycopène. La coloration jaune est due à la présence de flavonoïdes.

Du fait de la ressemblance de ce mutant avec le mutant *immutans* d'*Arabidopsis*, nous avons décidé de tester une éventuelle mutation de *ptox* chez *ghost*. Ainsi le clonage de l'ADNc chez 2 plantes homozygotes pour *ghost* et chez 2 plantes sauvages du même cultivar (San Marzano) ont permis de mettre en évidence une mutation chez *ghost* conduisant à l'apparition d'un codon stop dans la phase de lecture de *ptox* (fig. 3.2). Ainsi, l'insertion d'un T en position 258 dans l'ADNc *ghost* produit un changement de cadre de lecture introduisant un codon stop TGA à proximité de la mutation.



Fig 3.2: Séquences de l'ADNc correspondant à PTOX chez une tomate sauvage (cultivar San Marzano, SM) et chez le mutant *ghost*. L'insertion d'une thymidine en position 258 introduit un changement de cadre de lecture aboutissant à un codon stop prématuré.

L'absence de PTOX chez le mutant *ghost* a été vérifiée par immunodétection (fig. 3.3). Ainsi le mutant *ghost* de tomate est bien l'équivalent du mutant *immutans* d'*Arabidopsis*, et est totalement déficient en PTOX.

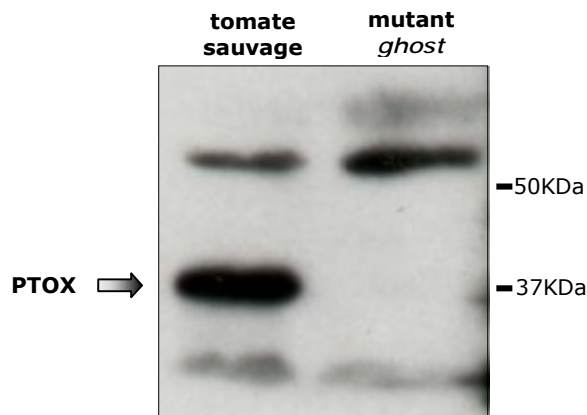


Fig 3.3: Détection de PTOX dans extraits plastidiaux de feuilles de tomate. SDS-PAGE 12,5% de 50µg de protéines de isolées à partir d'extraits de feuilles de tomates sauvage ou *ghost* (cultivar SM) suivie d'un transfert. Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000.

Ceci confirme donc qu'en l'absence de PTOX, il est impossible de former des caroténoïdes dans les fleurs et fruits de tomates : PTOX. possède un rôle prépondérant dans l'accumulation des caroténoïdes dans les chloroplastes en plus de son rôle au cours de la différenciation des chloroplastes (Carol *et al.*, 1999 ; Wu *et al.*, 1999).

1.2) Surenexpression de PTOX chez la tomate

Si l'absence de PTOX entraîne un blocage de la production de caroténoïdes, est-ce que la surenexpression de PTOX pourrait augmenter la production cette biosynthèse ? C'est la question à laquelle nous avons voulu répondre en produisant une lignée de tomates transgéniques exprimant l'ADNc de *ptox* d'*Arabidopsis* sous le contrôle d'un promoteur fort (cf. Matériels et méthodes § III.3).

La présence du transgène chez 5 plantes transformées (nommées i1, i2, i3, E1 et E2) a été vérifiée par PCR sur l'ADN génomique des plantes présentant une résistance à la kanamycine, ceci en utilisant des amorces spécifiques du gène *nptII* (codant pour la résistance à la kanamycine), et des amorces amplifiant spécifiquement l'ADNc de *ptox* d'*A. thaliana* (fig. 3.4).

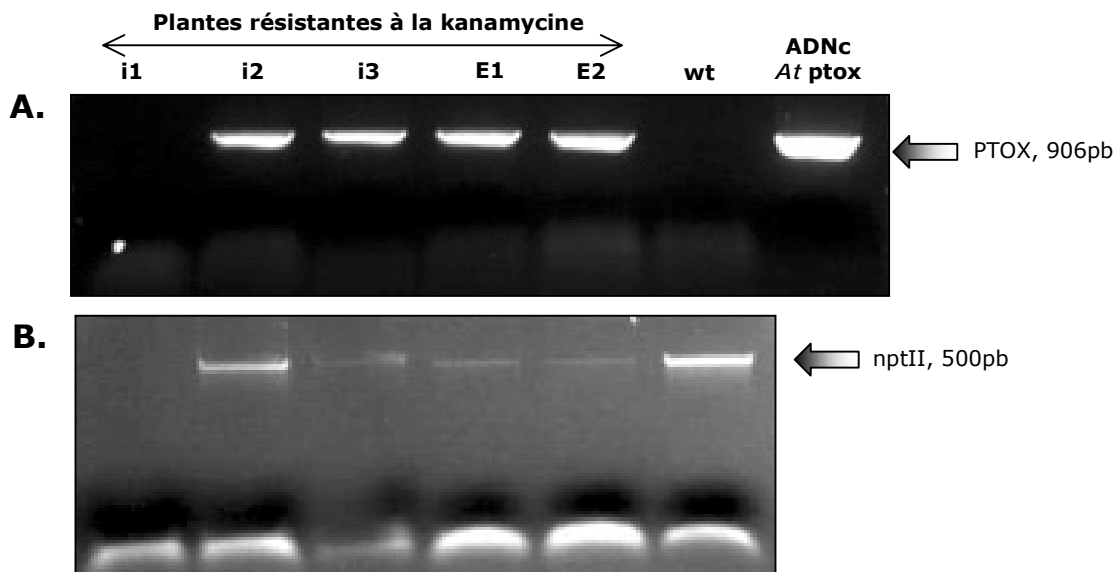


Fig 3.4: Vérification de la présence du transgène par PCR sur l'ADN génomique des plantes résistant à la kanamycine. A : amplification avec les amorces : GCAACGATTTTGCAAGACG et TTAACCTTGTAATGGATTCTTGAG amplifiant un fragment de 906pb sur l'ADNc de *ptox* d'*Arabidopsis*. B : amplification avec les amorces GTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG et ATTGCGCGTTCAAAGTCGCC amplifiant un fragment de 500pb sur le gène *nptII*.

Nous avons ainsi obtenu 4 transformants primaires indépendants possédant la construction 35S :: *ptox*. De façon intéressante, ces 4 transformants ne présentaient pas de phénotype visuel particulier. Le niveau d'expression de PTOX chez ces plantes a par la suite été estimé par western blot (fig. 3.5), et permet de constater une hétérogénéité des niveaux d'expression au sein de ces 4 lignées, qui pourraient traduire des insertions multiples ou des insertions dans une partie active du génome.

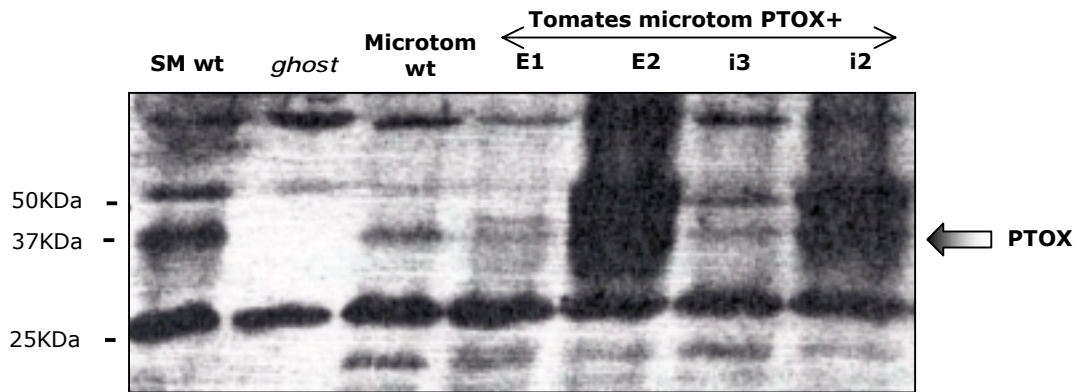


Fig 3.5: Niveau d'expression de PTOX chez les transformants primaires. SDS-PAGE de 50 μ g de protéines insolubles de feuilles de tomates, suivie d'un transfert. Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000.

Si les lignées E1 et i3 ne présentent pas une accumulation de PTOX plus forte que chez le sauvage, les lignées i2 et E2 accumulent très fortement la protéine. C'est pourquoi nous avons analysé la composition en caroténoïdes des fruits rouges de ces 2 lignées. (fig. 3.6, Matériels et méthodes § II.5).

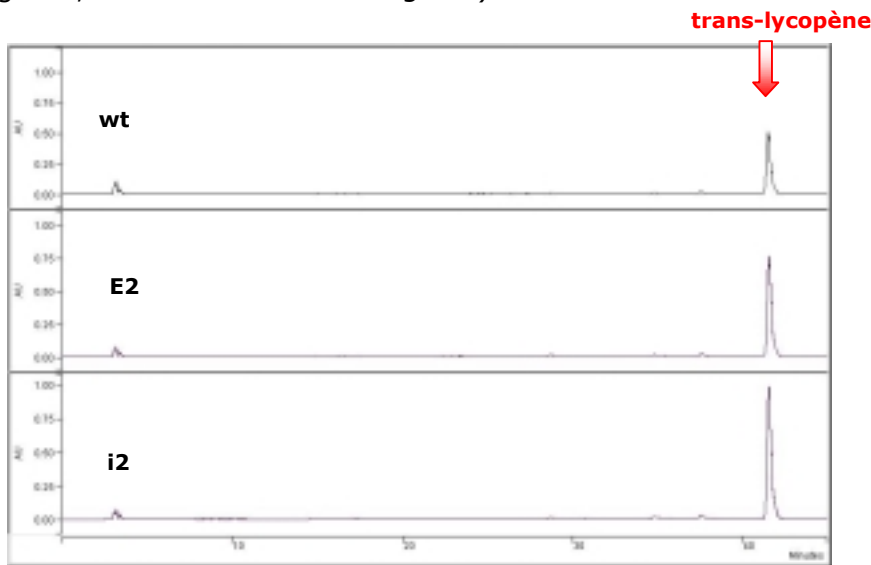


Fig 3.6: Analyse par HPLC de la composition pigmentaire des fruits de tomates. Analyse effectuée sur un pool de 3 fruits rouges provenant du même plant. Chromatogramme de sortie de colonne indiquant les temps de rétention des différents pigments. A cette échelle, seul le pic de trans-lycopène est visible. La quantité de caroténoïdes est ici normalisée par rapport rapportée au poids sec des fruits.

La comparaison des ces chromatogrammes ont montré pour la quantité de caroténoïdes exprimée :

.. une augmentation de 60% pour E2 et de 96% pour i2 de la quantité de caroténoïdes totaux par rapport au fruit sauvage.

.. cette augmentation correspond essentiellement à une accumulation de lycopène-cis (respectivement 55 et 99%) et de lycopène-trans (respectivement 61 et 100%).

.. les quantités de lutéine (+32% et -11% respectivement) et de β -carotène (+44% et +4% respectivement) ne présentent pas un profil aussi clair. Précisons néanmoins que ces 2 espèces ne représentent que 2% des caroténoïdes totaux dans les fruits

Il y a ainsi corrélation entre une accumulation de PTOX et une accumulation de lycopène dans les fruits rouges. Cependant, la quantité de lycopène accumulée dans les fruits rouges de i2 est plus importante que chez E2, alors que le western de la figure 3.5 montre clairement qu'E2 est un très fort surexprimeur. D'autre part, il est nécessaire de signaler que l'aspect du broyat obtenu à partir des fruits wt est différent de ceux obtenus à partir des fruits PTOX+ : plus dense, un même poids correspondant à un volume plus petit. Ceci pourrait correspondre à des différences de structures au sein du fruit de tomate que nous n'avons pas observé de façon évidente, telle qu'une gelée plus abondante, ou une quantité de peau moins importante.

Il est ainsi difficile de conclure à un effet certain de la surexpression de PTOX sur l'accumulation de caroténoïdes dans le fruit sans poursuivre plus en avant l'analyse de ces lignées transgéniques. La descendance de ces transformants primaires est en cours de production, et de la composition pigmentaire des fruits à différents stades de développement permettra d'infirmier ou de confirmer cette corrélation.

1) Rôle de PTOX dans la chlororespiration

La chlororespiration a été définie comme une chaîne respiratoire de transport d'électrons connectée à la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques de la membrane thylacoïdienne (pour revue, Cournac et Peltier, 2002 ; cf. Introduction §1.2.2).

Si l'existence d'un système enzymatique permettant la réduction non-photochimique du pool de plastoquinone a été extensivement mise en évidence suite à la caractérisation du complexe NDH chloroplastique (cf. Introduction §1.2.2), jusqu'au début de la présente étude, l'existence d'une oxydase branchée sur le pool des quinones a été matière à débat.

1.1) Implication de PTOX dans la chlororespiration chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse – utilisant de l' O_2 marqué ^{18}O – sur des préparations de *C. reinhardtii* ne possédant pas de complexe cytochrome b6/f ou de PSI, il a été possible de montrer qu'il existe un flux d'électrons provenant du PSII dirigé vers une oxydase plastidiale utilisant l' O_2 comme accepteur final d'électrons (Cournac *et al.*, 2000). Ce flux d'électrons est insensible au SHAM et fortement inhibé par le n-propyl gallate (Cournac *et al.*, 2000).

Nous avons vu au cours du chapitre précédent que PTOX est une plastoquinol-oxygène oxydo-réductase dont l'activité est peu sensible au SHAM et comparativement beaucoup

plus fortement inhibée par le nPG (chapitre 2, §5). Ainsi le transport d'électrons identifié chez *C. reinhardtii* présente des propriétés pharmacologiques similaires à celles de PTOX.

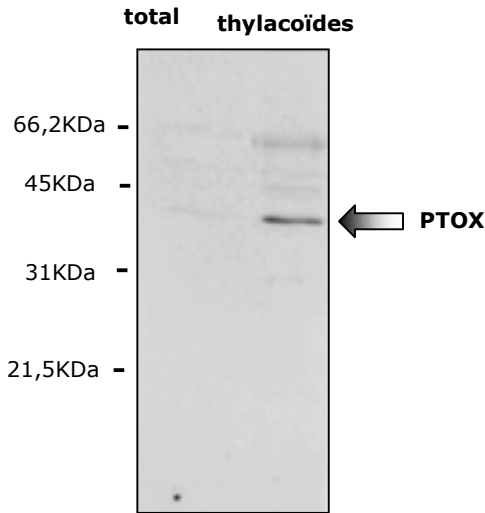


Fig 3.7:

Détection de PTOX chez *C. reinhardtii*. SDS-PAGE de protéines isolées à partir d'extraits cellulaires totaux ou d'extraits thylacoïdiens de *C. reinhardtii* (Cournac et al., 2000) suivie d'un transfert.

Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/10000.

De plus, l'anticorps anti-PTOX dont nous disposons a été capable de reconnaître un polypeptide d'une taille supérieure à 40KDa au sein des membranes thylacoïdiennes de *C. reinhardtii*, ce qui est proche de la taille observée chez d'autres organismes testés (cf. chapitre 1). Aussi avons nous proposé que ce polypeptide corresponde à l'oxydase plastidiale dont l'existence a été déduite par une approche physiologique. La récente obtention d'une séquence d'une quinol-oxygène oxydoréductase à destinée chloroplastique chez *C. reinhardtii* (cf. chapitre 2, §5, fig. 2.12) a permis de confirmer la présence d'un homologue de PTOX dans le génome de cette algue. Nous avons vu au chapitre 2 que cette séquence présente une partie N-terminale allongée, lui conférant une taille théorique de 49KDa. Il est néanmoins difficile de déterminer avec précision la taille du peptide d'adressage au chloroplaste de cette séquence, aussi n'est-il pas impossible que la masse apparente de la forme mature de PTOX chez *C. reinhardtii* soit proche de 40KDa.

1.2) Implication de PTOX dans la chlororespiration chez *Nicotiana tabacum*

Afin de déterminer si PTOX est capable d'agir comme une plastoquinol oxydase dans les chloroplastes de plantes supérieures, l'ADNc de *ptox* d'*A. thaliana* a été exprimé chez le tabac sous le contrôle d'un promoteur fort constitutif (Joët et al., 2002 ; construction décrite dans Matériels et méthodes partie III, identique à celle utilisée pour la production des tomates PTOX+).

A partir de 6 transformants primaires, 2 lignées présentant une forte expression du transgène ont été sélectionnées. L'expression de PTOX dans ces lignées a été vérifiée par RT-PCR (fig. 3.8A) et par immunodétection (fig. 3.8B). Alors qu'aucun signal n'est détectable par RT-PCR chez le tabac sauvage, un très fort signal est détecté chez les lignées transgéniques. Une réamplification de cette réaction permet de mettre en évidence une faible bande chez le tabac sauvage, dont la spécificité a été vérifiée par Southern blot (non présenté), mettant en évidence une réaction croisée de la sonde

spécifique de *ptox* d'*A.thaliana* avec *ptox* de *N. tabacum*. Ainsi *ptox* est exprimé très faiblement dans les feuilles de tabacs sauvages. L'anticorps anti-*At*PTOX est capable de détecter une quantité abondante de PTOX dans les extraits insolubles de protéines de feuilles de tabacs transgéniques, alors qu'aucun signal n'est détectable chez le tabac sauvage. Il est peu probable qu'il s'agisse ici d'un défaut de reconnaissance croisé chez le tabac de l'anticorps produit contre la protéine d'*A. thaliana*, puisque dans d'autres conditions, ce même anticorps est capable de reconnaître un polypeptide chez *N. tabacum* (Baena-Gonzalez *et al.*, 2003). Il est donc vraisemblable que l'enzyme native est présente en quantité trop faible pour être détectée ici. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le complexe NDH, l'autre composante de la chaîne de transfert d'électrons de la chlororespiration, est également présent en quantité très faible dans les feuilles (Sazanov *et al.*, 1998).

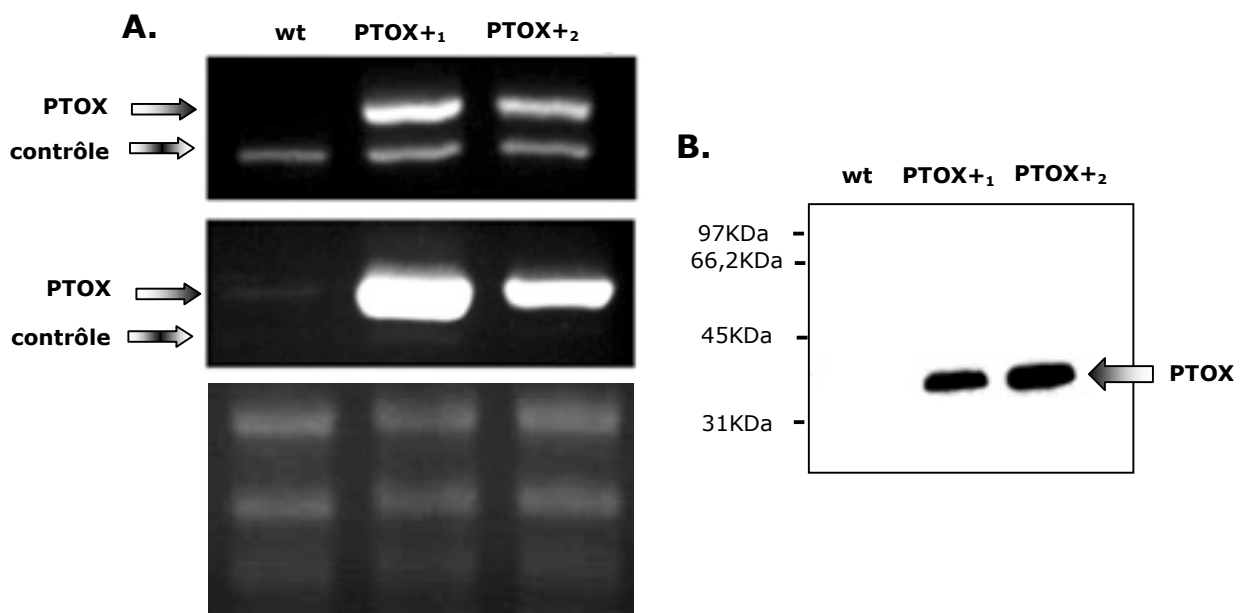


Fig 3.8 Accumulation de transcrits et de protéine *At*-PTOX dans les lignées de tabac transgéniques *PTOX+*. **A:** Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits de la RT-PCR sur les ARNm totaux des différents échantillons. Amplification à l'aide des amorces décrites au chapitre 4, §1.3 (panneau du haut) suivie d'une seconde amplification (panneau du milieu). Le panneau du bas présente une coloration du gel d'ARN au BET. **B:** SDS-PAGE de 20µg de protéines insolubles de feuilles de tabacs sauvage ou transgéniques, suivie d'un transfert. Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000.

At-PTOX est retrouvée associée aux membranes thylacoïdiennes, indiquant un bon adressage de la protéine au sein des lignées transgéniques, et plus précisément aux lamelles stromatiques (cf. Chapitre 1, fig. 1.10), ce qui correspond également à la localisation du complexe NDH (Horvath *et al.*, 2000), suggérant une restriction de la localisation de la chlororespiration aux lamelles stromatiques et absente des grana thylacoïdiens.

Puisque nous avons vu précédemment que PTOX est impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes, et étant donné que la surproduction de PTOX chez la tomate a une incidence sur la composition en caroténoïdes de ses fruits, nous avons voulu analyser la composition pigmentaire des feuilles de tabacs. L'analyse par HPLC de la composition pigmentaire des feuilles de tabac sauvage et PTOX₊₁ (fig.3.9) montre un profil tout à fait similaire dans les 2 cas. D'autre part, après transfert sous lumière plus forte, des quantités identiques de violaxanthine, de zéaxanthine et d'anthéroxanthine sont détectées dans les 2 cas (non présenté). Ceci indique que la quantité de PTOX n'est pas le facteur limitant de la production de caroténoïdes dans les chloroplastes de feuilles de *N. tabacum*. Cependant, PTOX est exprimé de façon ubiquitaire, du moins chez *A. thaliana* (Aluru *et al.*, 2001), suggérant un rôle plus global de cette protéine au sein du métabolisme plastidial.

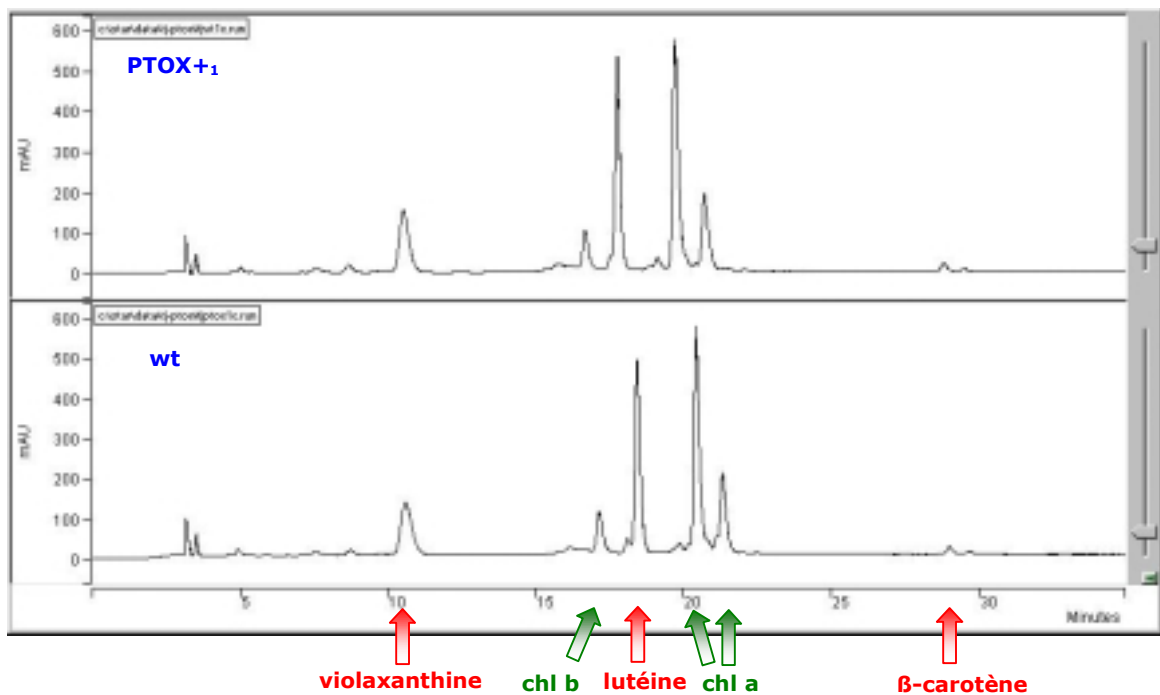


Fig 3.9: Analyse par HPLC de la composition pigmentaire des feuilles de tabac PTOX⁺ et sauvage. Les pics correspondant aux principaux caroténoïdes sont indiqués par une flèche.

L'utilisation d'une combinaison de mesures de spectrométrie de masse et de mesures de fluorescence a alors permis de mettre en évidence une activité d' *At*PTOX dans les lignées transgéniques pour lesquelles une forte ré-oxydation non-photochimique des PQ, inhibée par une addition de n-propyl-gallate, a été observée (Joët *et al.*, 2002), indiquant qu'*At*PTOX est capable d'oxyder le pool de PQ en utilisant l'O₂ comme accepteur terminal d'électrons. Ceci est donc en accord avec les observations décrites précédemment chez *C. reinhardtii* déficient en PSI.

D'autre part, chez les plantes sauvages, une sur-réduction transitoire des transporteurs d'électrons photosynthétiques se produit au cours de la phase d'induction de la photosynthèse, ceci car le cycle de réduction du carbone n'est pas actif à l'obscurité,

puisque certaines enzymes de ce cycle nécessitent une activation par la lumière *via* la thioredoxine réduite (Ruelland et Miginiac-Maslow, 1999). Dans les lignées transgéniques exprimant *AtPTOX*, cette sur-réduction transitoire est fortement minimisée, indiquant que les électrons sont dirigés vers l' O_2 *via* PTOX (Joët *et al.*, 2002). Ceci suggère que PTOX pourrait potentiellement prévenir une sur-réduction de la plastoquinone à la lumière, agissant ici comme une valve de sécurité à l'instar du rôle joué par l'AOX au sein de la mitochondrie (cf. Introduction, §4.5).

Il est cependant important de noter les plantes exprimant *AtPTOX* ne présentent pas une résistance accrue à la photoinhibition (Joët *et al.*, 2002). Ceci n'exclue pour autant pas que pour des plantes adaptées à des conditions physiologiques stressantes, PTOX pourrait participer à la résistance à la photoinhibition, ce qui sera l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE 4 :
PTOX ET STRESS, RÔLE DANS
L'ADAPTATION DES PLANTES À L'ALTITUDE

CHAPITRE 4 :

PTOX ET STRESS, ROLE DANS L'ADAPTATION DES PLANTES A L'ALTITUDE

Nous avons vu dans le chapitre 1 que PTOX est localisée dans les membranes thylacoïdiennes, donc en possible interaction avec la chaîne de transfert d'électrons de la photosynthèse. De plus, elle semble participer à un mécanisme de transfert d'électrons alternatif au sein de la chlororespiration (cf. chapitre 3)

D'autre part, étant donné que l'un des rôles attribués à l'AOX est celui de valve de sécurité au sein de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale, en permettant de prévenir une sur-réduction du pool de quinone (cf. Introduction, §3), on pourrait envisager un rôle similaire pour PTOX dans le plaste.

Nous avons également vu qu'il existe de nombreuses conditions dans lesquelles un pool de plastoquinone est sur-réduit dans le plaste : les variations de température, l'augmentation de lumière, la baisse de la quantité de CO₂ disponible, la déshydratation, l'hypoxie, les attaques parasitaires sont autant de conditions stressantes pouvant résulter en une saturation de la chaîne de transfert d'électrons (cf. Introduction). Ces différents stress, s'ils ne se prolongent pas longtemps, sont correctement gérés par les plantes, qui doivent nécessairement être adaptées aux conditions environnementales variables, puisqu'elles ne vivent pas naturellement dans des conditions de croissance contrôlées et optimales.

Afin d'étudier le potentiel rôle de PTOX dans les mécanismes de résistance au stress, nous avons profité de notre environnement Grenoblois et de la proximité de la station alpine du col du Lautaret pour nous intégrer dans les études qui y sont menées sur l'adaptation des plantes à la vie en montagne. En effet, les plantes poussant en haute altitude sont exposées à un environnement extrême et parfois très contrasté, avec la plupart du temps un climat froid, une forte luminosité, une pression de CO₂ diminuée, un vent fort, des apports en eau et en nutriments imprévisibles, et une exposition à des dommages mécaniques fréquents suite à la chute de pierres (dans le cas de plantes d'éboulis comme la renoncule des glaciers). De plus, la saison alpine permettant la croissance des plantes est très courte : afin d'accomplir leur cycle annuel en 2 à 3 mois, les plantes d'altitude ont donc besoin d'avoir un système d'assimilation du carbone très efficace (Streb *et al.*, 1997). Deux impératifs opposés se présentent : l'optimisation de leur système photosynthétique afin d'assimiler un maximum de carbone en un minimum de temps, et la protection de ce dernier contre les dommages causés par les conditions stressantes de vie en altitude, ceci afin d'éviter de se retrouver dans des conditions de photoinhibition (cf. introduction).

Même s'il est possible d'acclimater des plantes de plaine à des températures assez basses et à une intensité lumineuse importante (Öquist *et al.*, 1993 ; Savitch *et al.*, 2001 ; Streb *et al.*, 1999), la tolérance aux stress lumineux chez ces espèces reste beaucoup plus faible que celle des plantes de haute montagne (Streb *et al.*, 1997 ; 1998), ce qui suggère que l'adaptation chez les plantes alpines dépend aussi de la présence de mécanismes de protection spécifiques.

PTOX est exprimée de façon plus importante à la lumière qu'à l'obscurité (Rizhsky *et al.*, 2002 ; Simkin, 2002). D'autre part, PTOX participe à la biosynthèse des caroténoïdes, et ces derniers sont un des éléments fondamentaux de la protection de l'appareil photosynthétique contre les méfaits de la lumière à haute dose (par leur rôle de quencher des états excités de la chlorophylle et leur participation au cycle de dissipation de l'excès d'énergie, cf. Introduction §1.3.2 et 1.3.3) : PTOX pourrait donc être impliquée dans la lutte contre le stress de par son rôle d'enzyme de la biosynthèse des caroténoïdes comme dans un éventuel rôle de valve de sécurité plastidiale.

De façon plus large, nous avons également voulu voir comment certains caroténoïdes, et en particulier les xanthophylles, étaient capables d'intervenir dans la résistance à la photoinhibition, et notamment s'ils pouvaient expliquer les propriétés de résistance très différente qu'on peut retrouver au sein d'un même genre . Nous avons pour ceci mesuré le cycle des xanthophylles dans 3 espèces du genre *Geum*, déjà étudiées à la station alpine du col du Lautaret, et qui présentent des caractéristiques de résistance à la photosynthèse corrélées à leur distribution en altitude (Tcherkez *et al.*, en préparation).

RESULTATS & DISCUSSION

1) Expression de PTOX chez les plantes alpines

PTOX est présente en quantité assez réduite chez la plupart des espèces végétales, et n'est même la plupart du temps pas détectable sur des extraits totaux de feuilles (cf. chapitre 1). Cependant, même si l'anticorps dont nous disposons a été produit contre la protéine d'*Arabidopsis thaliana*, il est capable de reconnaître PTOX chez plusieurs organismes différents (*Arabidopsis thaliana*, la tomate, le poivron, *Chlamydomonas reinhardtii*). Aussi était-il intéressant de savoir si cet anticorps pouvait reconnaître PTOX dans différentes plantes alpines, et également de savoir si la quantité de PTOX dans ces plantes était détectable.

1.1) Détection de PTOX chez une benoîte

Avant de s'engager dans l'étude des plantes alpines proprement dite, nous avons donc voulu vérifier si l'anticorps anti-PTOX pouvait détecter PTOX dans des plantes du genre *Geum*. Il existe plusieurs espèces de Benoîte poussant en plaine, et pour des raisons pratiques, nous avons choisi d'utiliser *Geum rivale* (fig 4.1A), la benoîte des ruisseaux, qui pousse en quantité importante dans les plaines de la région grenobloise.

Sachant qu'il est très difficile voire parfois impossible de détecter PTOX sur des extraits totaux de plantes, nous avons dans un premier temps mis au point un protocole de purification de chloroplastes intacts de *Geum* (cf Matériels et Méthodes) conduisant à des rendements de purification corrects. Une étape supplémentaire de purification a été effectuée en isolant les protéines insolubles des chloroplastes. La figure 4.1B montre le résultat d'un western blot effectué sur ce matériel. En contrôle ont été déposées des protéines chloroplastiques insolubles de feuilles de tomate sauvages, dont nous savons

que la protéine est reconnue par l’anticorps (cf. chap 1), ainsi que du mutant de tomate Δ PTOX *ghost*. On voit ainsi assez clairement qu’un doublet est détecté à la taille attendue, alors que rien n’est détecté à cette taille chez le mutant *ghost*. L’existence d’un tel doublet (également observé chez le poivron) peut s’expliquer de différentes façons : il peut s’agir de la protéine et de son précurseur non mature, contenant un peptide de transit, de 2 formes de la protéine, dont l’une comporterait des modifications post-traductionnelles, ou de la protéine et d’un sous-produit de dégradation. Enfin, on ne peut pas exclure la présence d’une protéine différente reconnue par l’anticorps.

En conclusion , l’anticorps anti-PTOX reconnaît une protéine chez une plante du genre *Geum*.

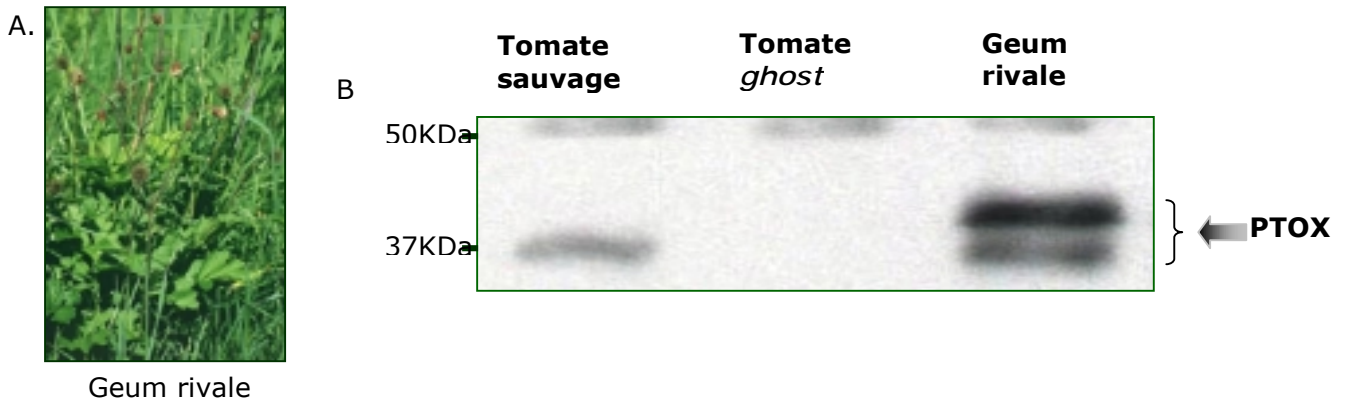


Fig 4.1: Reconnaissance par l’anticorps de PTOX chez une benoîte. A: *Geum rivale*, la benoîte des ruisseaux. B: SDS-PAGE de 50 à 100 μ g de protéines insolubles de chloroplastes de différentes plantes, suivie d’un transfert et d’une immunodétection avec l’anti-PTOX au 1/15000.

1.2) Détection de PTOX par western blot chez les plantes alpines

La figure 4.2 présente les différentes plantes alpines testées ici. 4 plantes différentes ont été choisies : *Geum montanum*, *Geum reptans*, *Ranunculus glacialis* et *Arabis alpina*. Elles poussent dans le même type d’habitat rocailleux, en altitude élevée (2600m) et appartiennent à 3 familles différentes, respectivement Rosacées , Renonculacées et Crucifères. Parmi elles, seule *Geum montanum* pousse également à plus basse altitude, en prairie alpine (2100-2300m).

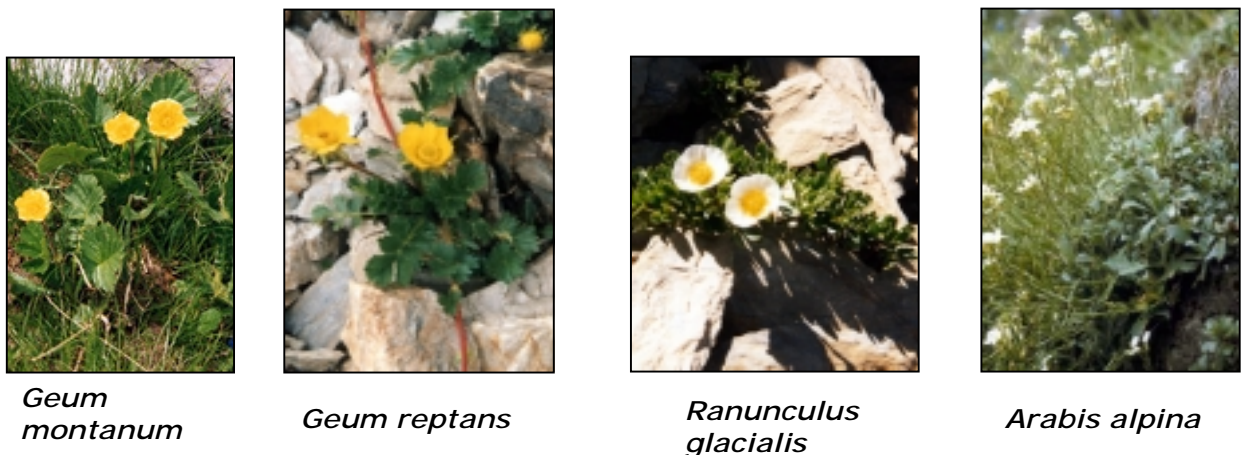


Fig 4.2: Plantes alpines utilisées au §1.

La figure 4.3 présente le résultat d'un western blot effectué sur les protéines insolubles de ces différentes plantes alpines.

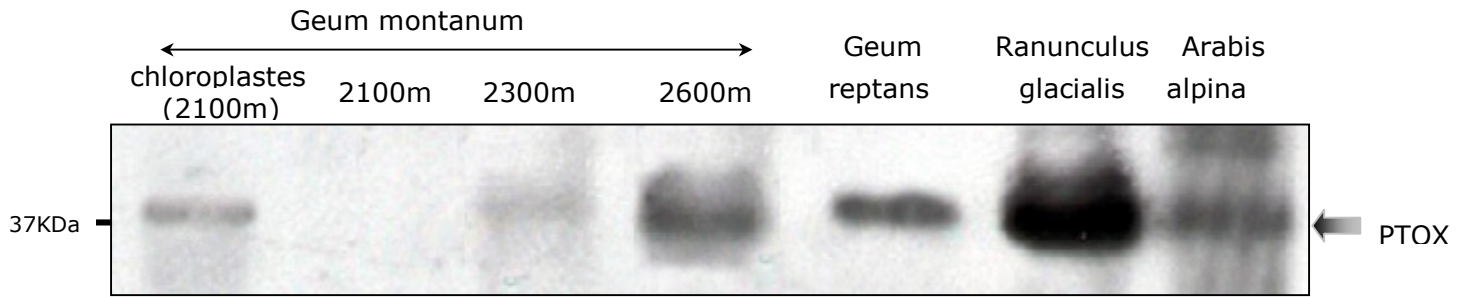


Fig 4.3: Niveau d'expression de PTOX dans les plantes alpines. SDS-PAGE d'environ 60µg de protéines insolubles totales ou chloroplastiques suivie d'un transfert. Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000.

Plusieurs éléments sont notables ici :

.. Tout d'abord, l'anticorps anti-PTOX reconnaît une protéine à 37KDa, taille attendue pour PTOX chez *Arabidopsis thaliana*, ceci dans toutes les plantes testées. Cet anticorps est donc capable de reconnaître PTOX chez de nombreuses espèces.

.. La quantité de PTOX retrouvée chez *Geum montanum* semble assez bien corrélée à l'altitude : dans les extraits de plantes récoltées à 2100m, PTOX n'est détectable que dans la fraction enrichie en chloroplastes, et non dans la fraction des protéines insolubles. Ceci montre que la protéine est effectivement présente mais en quantité très faible. Le signal est par contre de plus en plus fort dans les fractions insolubles de plantes récoltées à 2300 et 2600m d'altitude. Cette différence d'altitude de récolte correspond ici à une différence d'habitat : en effet, à 2100m, au niveau du col du Lautaret, les *Geum montanum* font partie de la pelouse de la prairie alpine qu'on retrouve à cette hauteur. A la période à laquelle a été effectuée cette récolte (début juillet), les herbacées voisines ont également déjà poussé, et les benoîtes se retrouvent la plupart du temps en-dessous d'un tapis d'herbes plus hautes : elles sont alors relativement bien protégées du soleil et du vent. La situation est très différente pour les 2 autres prélèvements. *Geum montanum* étant une espèce pérenne, qui survit sous la neige pendant toute l'année, elle est la première à être présente lors de la fonte des neiges. Les prélèvements à haute altitude ont été effectués peu après la fonte des neiges, dans une situation où la benoîte était encore relativement seule et très exposée au soleil et au vent. On peut donc dans ces conditions penser que l'état de stress de ces plantes était plus important. Il est néanmoins impossible d'exclure ici la possibilité que cette différence de niveau d'expression de PTOX dans les échantillons de *Geum montanum* soit due à un état de développement différent.

.. La quantité de PTOX retrouvée chez *Geum reptans*, la benoîte rampante, est très similaire à ce qu'on retrouve chez la plante apparentée *Geum montanum* prélevée à haute altitude. Il est intéressant de remarquer que les benoîtes rampantes poussent au niveau du col du Galibier (2600m) dans un environnement rocailleux et très exposé à de fortes intensités lumineuses (aux environs de 2200 µmol.m²s⁻¹ pour une journée ensoleillée).

.. *Arabis alpina*, l'arabette des Alpes, présente un niveau d'expression de PTOX similaire à ce qui a été décrit précédemment. Elle pousse dans le même secteur que *Geum reptans*. L'intérêt d'avoir utilisé cette espèce tient au fait qu'il s'agit d'une espèce proche d'*Arabidopsis thaliana*, de laquelle provient la protéine ayant permis de produire l'anticorps que nous utilisons. Cet échantillon nous a donc servi de "contrôle" de spécificité de notre anticorps, car il était plus probable que chez cette espèce, on observe une bonne reconnaissance de PTOX. Si le signal avait été beaucoup plus fort pour cet échantillon que pour les autres, on aurait pu penser à une reconnaissance faible de PTOX chez les 2 rosacées (*Geum*) du fait d'un éloignement important entre PTOX de crucifère et PTOX de rosacée. On peut voir qu'il n'y a pas de différence importante de détection de PTOX entre les différentes plantes récoltées au col du Galibier : ainsi le niveau de PTOX dans les 2 rosacées n'est sans doute pas sous-estimé.

.. La quantité de PTOX retrouvée chez *Ranunculus glacialis*, la renoncule des glaciers, est beaucoup plus importante. Cette renoncule partage le même habitat que *Geum reptans*, et ces deux espèces poussent assez souvent à proximité (cf. fig 4.4) : les différences ne peuvent donc pas s'expliquer par des conditions de vies variables entre les 2 espèces. Il est possible que l'anticorps dont nous disposons présente une reconnaissance accrue pour PTOX de renonculacée, ce que nous devons vérifier dans le futur par clonage et comparaison des ADNc. L'autre explication est simplement une quantité plus importante de PTOX chez cette plante. Nous reviendrons plus en détail sur le cas de la renoncule des glaciers dans la dernière partie de ce chapitre.



Fig 4.4: *Renoncule des glaciers et benoîte rampante partageant le même habitat à proximité du col du Galibier (environ 2600m d'altitude)*

Ainsi, nous avons vu qu'il est possible de détecter PTOX sur des fractions insolubles de plantes alpines poussant à haute altitude, dans des conditions où elles doivent être acclimatées au stress provoqué en grande partie par la luminosité très élevée et les variations de température importantes. Ces résultats préliminaires semblent montrer qu'il peut y avoir une corrélation entre niveau de stress et expression de PTOX, puisque notre protéine n'est pas détectable lorsque les *Geum montanum* poussent dans des conditions relativement protégées comme c'est le cas dans les pelouses du col du Lautaret.

1.3) Détection de PTOX par RT-PCR chez les plantes alpines

Afin de montrer que le gène PTOX est exprimé chez les plantes alpines testées, nous avons cherché à amplifier par RT-PCR un fragment correspondant à PTOX. Des amorces dégénérées ont été choisies dans des régions assez similaires de PTOX suivant les séquences connues dans différentes espèces. La figure 4.5 représente un alignement des 4 séquences de PTOX d'*Arabidopsis*, de riz, de tomate et de poivron, ainsi que la séquences des oligonucléotides que nous avons choisis pour nos RT-PCR.

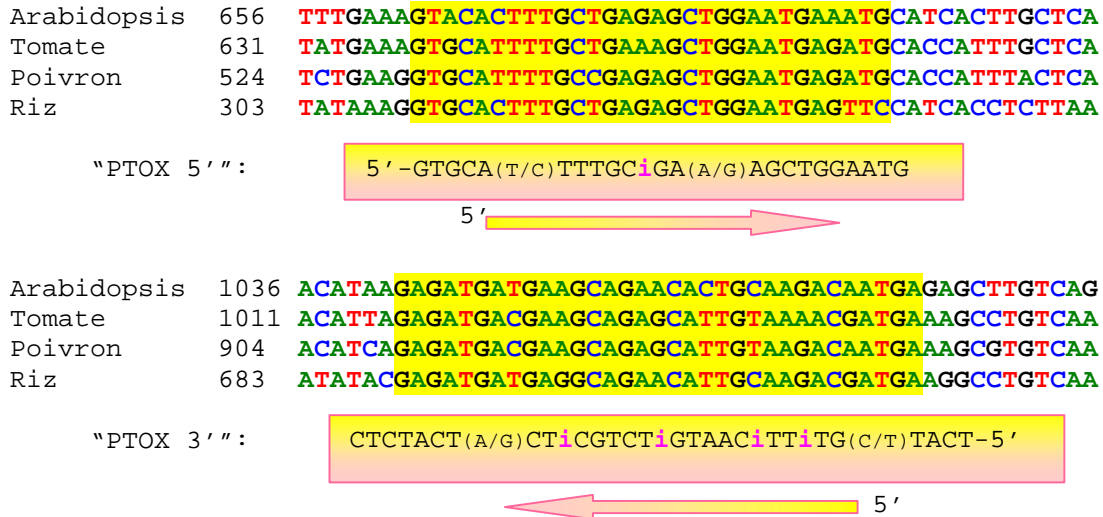


Fig 4.5: Séquences des amorces dégénérées utilisées pour le RT-PCR. *i*=desoxy-inosine

La figure 4.6 présente le résultat de la RT-PCR effectuée sur des ARN totaux : il n'a été possible de détecter la présence du transcrit ptox que chez *Ranunculus glacialis*, et ce malgré de nombreux essais. Il est possible que la séquence de ptox chez les *Geum* et chez *Arabis alpina* soit très différente de celles connues jusqu'alors, du moins dans cette région, ou que les ARN correspondant à PTOX soient vraiment présents en très faible quantité. Le fragment obtenu pour *R. glacialis* a été cloné et séquencé.

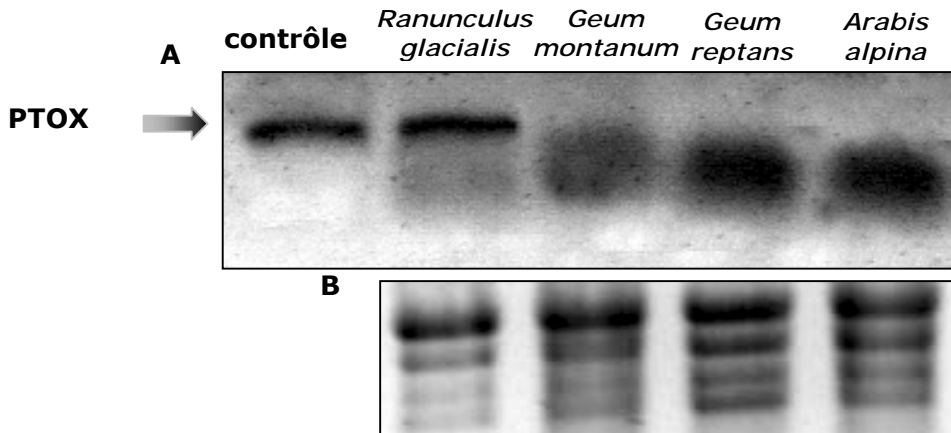


Fig 4.6: Niveau d'expression de PTOX dans les plantes alpines. A: RT-PCR à partir d'1µg d'ARN des différentes plantes alpines. Contrôle: RT-PCR sur 1µg d'ARN de fruit rouge de tomate. B: Contrôle de charge: coloration du gel d'ARN au BET.

La figure 4.7 présente le résultat du séquençage. L’alignement des ADNc connus et de ce fragment montre qu’il s’agit bien de PTOX et que l’amplification obtenue ici est bien spécifique. L’alignement des séquences peptidiques déduites de ces ADNc (fig 4.8) montre une très forte conservation de séquences, et notamment dans les 2 régions fixant le fer qui sont couvertes par notre fragment. Il serait intéressant d’utiliser ce fragment comme sonde en northern blot pour évaluer la taille de l’ARNm correspondant et ultérieurement pour isoler l’ADNc correspondant.

Arabidopsis	686	TGAAATGCATC	ACTTGGCTC	ATAATGGAAGAA	TTGGGTGGAAAT	CTTGGTGGTT	GATCGTTTTCT	TGGCT	
Riz	333	TGAGTTCCATC	ACCTCTTAAT	CATGGAAGAA	TTGGGTGGCAACT	CTTTATGGG	TTGATCGTTTTCT	TGGCA	
Tomate	661	TGAGATGCACC	ATTTGCTCATT	ATGGAAGAA	TTAGGGGGAAAT	GCTTGGTGG	TTGATCGATTTCT	TGGCA	
Poivron	554	TGAGATGCACC	ATTTACTCAT	TATGAGGAA	TTAGGTGGAAAT	GCTTGGTGG	TTGACCGATTCT	TGGCG	
R.glacialis	1	---	ATTGCACCAC	TTTATCAT	TGGAGGAACT	AGGTGGGAA	TGCCTGGTGG	TTTGACCGTTTTCT	TGGCT
Arabidopsis	756	CAGCACATAG	CAACCTTCT	ACTACTTTCAT	GACAGTTCCT	TGTATATCTT	AAGCCCTAGA	ATGGCATATC	
Riz	403	CGGTTTGTG	TCATTTTTT	ACTACTTTCAT	GACTGTTGCG	ATGTACATGG	TGAGCCCAAGA	ATGGCATATC	
Tomate	731	CAACATATAG	CTATATTTCT	TATATTTTCAT	GACAGTCTTG	ATGTATGCTT	TGAGCCCAGA	ATGGCATATC	
Poivron	624	CAACATATG	CTGTATTTCT	TATATTTTCAT	GACAGTCTCG	ATGTATGCTT	TGAGCCCAGA	ATGGCATATC	
R.glacialis	68	CAACACATT	GCAGTGT	TTTTATTACT	TTCATGACGG	TATTTATG	TACTTAATAA	GCCCCAGGATGGCATATC	
Arabidopsis	826	ACTTTTCGGA	ATGTTGGAG	AGTGCATG	CATATGAGAC	TTATGATAA	ATTTCTCAAG	GGCAGTGGAGAGGA	
Riz	473	ATTTTTCTGA	ATGTTGGAG	AGGCATGCG	TACTCAACCT	TATGACAAG	TTTTATTAAG	CTCCATGAAGATGA	
Tomate	801	ATTTCTCTGA	ATGTTGGAG	AGCCATGC	ATACGAGAC	TTACGATAA	ATTCATCAAG	GATCAAGGAGAGGA	
Poivron	694	ATTTCTCTGA	ATGTTGGAG	CACCATGC	ATACGAGAC	TTACGATAA	ATTCATCAAG	GATCAAGGAGAGGA	
R.glacialis	138	ATTTTTCTGA	ATGTTGGAG	GCATGCA	TTTTCAACT	TATGACAAG	TTTTATCAAG	AAAGAGGGTGATAT	
Arabidopsis	896	GTTGAAGAA	TATGCCTGC	ACCCGGAT	TATCGCAGT	AAAAACTA	TATACGGG	AGGTGACTTGTACT	TATTTGAT
Riz	543	GTTGAAAAAG	CTACCAGC	TCCCGAGG	CGGCTTTAA	ACTATTAC	CTGAATGAG	GATCTTTACT	TATTTCGAT
Tomate	871	ATTGAAGAA	TTGCCCGC	TCCAAAGAT	TGCAGTGG	ACTACTAC	CACGGGAG	GTACTTATAT	TATTTGAT
Poivron	764	ATTGAAGAA	TTGCCCGC	TCCAAAGAT	TGCAGTGG	ACTACTAC	CACGGGAG	GTACTTATAT	TATTTGAT
R.glacialis	208	GCTGAAAA	CAATGCCAG	CCCCGTGA	AATTTGCT	GCAAACTA	TACACTGA	AGGAGATTTAT	TATTTGTTGAT
Arabidopsis	966	GAGTTCCAAA	CATCAAGA	ACTCCCAAT	ACTCGAAG	ACCAGTAA	TAGAAAAT	CTATACGAT	GTGTTTGTGA
Riz	613	GAATTTCAA	ACAGAGT	CCCCATG	TTCAGGAG	ACCTAAAA	TTGATAAC	TTGTATGAT	GTATTTGTCA
Tomate	941	GAGTTTCAA	ACTCACG	AGAGCCTA	ATACTCGA	AGACCAAAA	TAGATAAT	CTCTATGAC	GTATTTGTGA
Poivron	834	GAGTTTCAA	ACTCACG	AGAGCCTA	ATACTCGA	AGACCAAAA	TAGATAAT	CTCTATGAC	GTATTTGTGA
R.glacialis	278	GAGTTTCAA	ACAGAG	CCGCTTCA	ACTCTCGA	AGACCTAAA	TAGAGAAC	TTGTACGAT	GTATTTGTGA
Arabidopsis	1036	ACATAAGAG	ATGATGA	AGCAGAAC	ACTGCAAG	ACAATGAG	AGCTTGT	CAGACTCTAG	GCAGTCTGCGTTC
Riz	683	ATATACGAG	ATGATGAG	GCAGAAC	ATTGCAAG	ACGATGA	AGGCCTGT	CAAACCAT	TGGAAACCTTCGTTC
Tomate	1011	ACATTAAG	ATGATGAG	CAAGCAG	AGCATTGT	AAAAAG	CGTGTCAA	ACTCACGG	GAGCCTTCGTTTC
Poivron	904	ACATTAAG	ATGATGAG	CAAGCAG	AGCATTGT	AAAAAG	CGTGTCAA	ACTCACGG	GAGCCTTCGTTTC
R.glacialis	348	ACATAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Fig 4.7: Alignement des séquences des ADNc de PTOX dans la région correspondant à la séquence obtenue chez la renoncule des glaciers.

Arabidopsis	148	SVLHMYETFG	WRRADYLV	HFAESWNE	MHELLIME	EELGGNS	WVDFRFLA	QHIATFYY	FMTVFLY	LISPRMAY	HFSECV				
Riz	134	SVLHMYETFG	WRRADYLV	HFAESWNE	MHELLIME	EELGGNS	LVDFRFLA	RFAAFFY	FMTVVMY	MVSPRMAY	HFSECV				
Tomate	159	SVLHMYESF	GWRRADY	MVHFAESW	NEHELLIME	EELGGNA	WVDFRFLA	QHIATFYY	FMTVLMY	ALISPRMAY	HFSECV				
Poivron	150	SVLHLYESF	GWRRADY	LKVHFAESW	NEHELLIME	EELGGNA	WVDFRFLA	QHIATFYY	FMTVSMY	ALISPRMAY	HFSECV				
R.glacialis	1	-----	-----	-----	HELLIME	EELGGNA	WVDFRFLA	QHIATFYY	FMTVVMY	LISPRMAY	HFSECV				
Arabidopsis	228	SHAYETYDK	FLKASGE	EELKNM	PAFDIAV	KYYTGG	DLYLDF	DEFQTS	RTPNTRR	PVIE	NLYDV	FVNIR	DDAEH	CKTMR	CAQ
Riz	214	RHAYSTYDK	FKLHEDE	LKKLP	AEALN	YYLN	EDLYLDF	DEFQTS	ARVPC	SRRPK	IDNLYD	VFNIR	DDAEH	CKTMR	CAQ
Tomate	239	SHAYETYDK	FIKDQGE	EELKNL	PAFKIAV	YYTGG	DLYLDF	DEFQTS	REPNT	RRPK	IDNLYD	VFMNIR	DDAEH	CKTMR	CAQ
Poivron	230	HHAYETYDK	FIKDQEA	EELKKLP	PAFKIAV	SYTGG	DLYLDF	DEFQTS	REPNT	RRPK	IDNLYD	VFMNIR	DDAEH	CKTMR	CAQ
R.glacialis	53	GHAFSTYDK	FIKKEG	DMLK	TMPE	IAVK	YYTEG	DLYLDF	DEFQTS	RPLQ	SRRPK	IE	NLYDV	FLNI	-----

Fig 4.8: Alignement des séquences peptidiques de PTOX dans la région correspondant à la séquence obtenue chez la renoncule des glaciers. Flèches rouges: sites de fixation du fer.

2) Stratégies de résistance à la photoinhibition chez les *Geum*

2.1) Données préliminaires

Des conditions de forte luminosité ou de basse température provoquent de nombreux dommages chez la majorité des plantes (cf. Introduction). Les plantes d'altitude subissent ce type de conditions climatiques de façon routinière, et possèdent donc la capacité d'y résister. C'est le cas de *Geum montanum*, qui présente une forte capacité de résistance aux dommages liés à une intensité lumineuse élevée (Manuel *et al.*, 1999), et présente les caractéristiques d'une plante adaptée au froid. Cette adaptation pourrait être liée d'une part à la mise en œuvre d'une photorespiration active, ainsi qu'à une ouverture des stomates à basse température en conditions stressantes, permettant une assimilation de CO₂ extérieur, et d'autre part à une redirection de l'excès d'énergie d'excitation vers le PSI, capable d'enclencher un transport cyclique des électrons sous forte illumination (Manuel *et al.*, 1999).

Dans la région du col du Lautaret, 3 espèces de benoîtes cohabitent, à des altitudes différentes : *Geum reptans*, *Geum montanum* et *Geum urbanum* (cf. Matériels et Méthodes et § 1.2). Leur capacité de résistance aux dommages causés par un stress lumineux est corrélée à leur distribution en altitude, l'espèce de plaine étant très peu résistante à la photoinhibition, contrairement aux espèces d'altitude (Tcherkez *et al.*, en préparation). La question soulevée par cette observation est la suivante : quels sont les mécanismes mis en œuvre par les espèces d'altitude pour expliquer une telle différence ?

Plusieurs paramètres ont été étudiés afin de répondre à cette question (Tcherkez *et al.*, en préparation). Ainsi, il est à noter que les 2 espèces d'altitude possèdent de nombreux trichomes, probablement responsables d'une capacité de réflexion de la lumière plus importante. D'autre part, l'inhibition de la photorespiration de feuilles détachées des benoîtes d'altitude par la phosphinotricine, inhibiteur de la glutamine synthase, provoque une très forte chute de leur résistance à la photoinhibition suite à une exposition à une forte luminosité : le rapport Fv/Fm chute de moitié par rapport à un témoin sans phosphinotricine, ainsi que le transport d'électrons photosynthétiques, et le niveau de réduction du pool de quinone augmente. Ainsi, la photorespiration semble jouer un rôle majeur dans le phénomène étudié ici (Tcherkez *et al.*, en préparation).

Nous avons voulu rechercher d'autres mécanismes expliquant ces différences de résistance au stress chez ces 3 espèces. Nous avons analysés d'une part sur le contenu en caroténoïdes de ces 3 espèces, puisque ces pigments sont impliqués dans les mécanismes de résistance à la photooxydation, et d'autre part sur le comportement de PTOX chez ces benoîtes.

2.2) Mesure du rapport Fv/Fm au cours de traitements stressants chez les 3 espèces de *Geum*

Afin d'évaluer la résistance au stress des 3 benoîtes étudiées, des mesures de fluorescence et l'évaluation du rapport Fv/Fm ont été effectuées sur des feuilles détachées ayant subi un stress lumineux suivi d'une période de récupération à l'obscurité (cf. Matériels & Méthodes, partie II § 3). Signalons que seules les feuilles de *Geum*

urbanum traitées à basse température (sur de la glace) présentent après stress des signes de dommages visibles dus à une destruction de la chlorophylle.

La figure 4.9 présente l'évolution du rapport Fv/Fm (cf. Matériels & Méthodes, partie II § 4) au cours des traitements effectués dans cette étude.

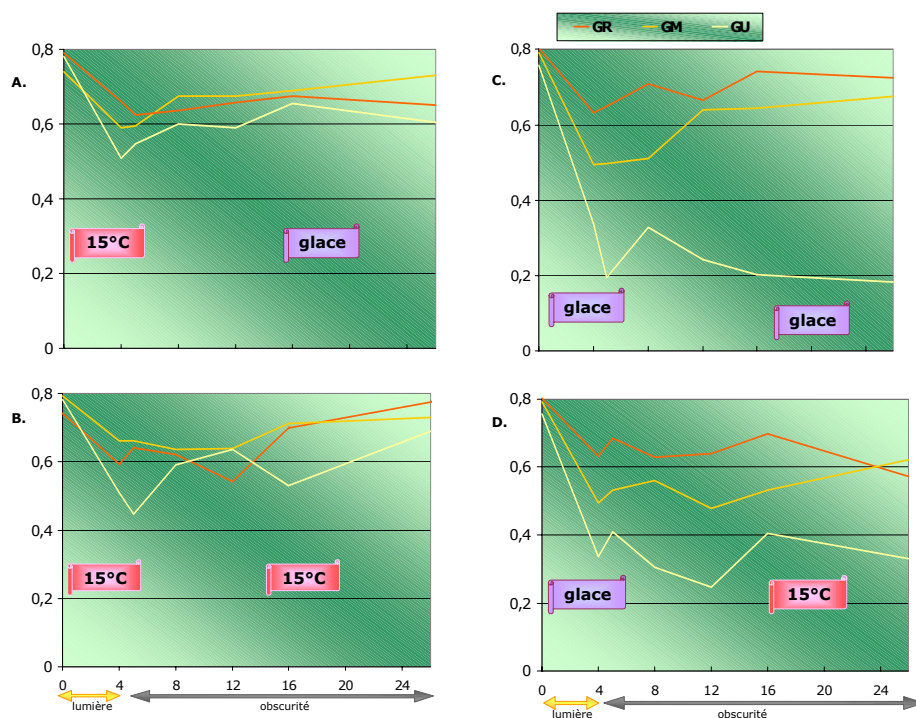


Fig 4.9: Effets conjugués des stress lumineux et thermiques sur l'évolution de la photoinhibition du PSII: mesure du rapport Fv/Fm au cours du traitement suivant: des feuilles détachées des différents *Geum* ont été éclairées pendant 4 h par une lumière d'une intensité correspondant à $2000\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR, puis laissées en phase de récupération à l'obscurité pendant plusieurs heures, et ceci soit sur la glace, soit à la surface d'une eau thermostatée à 15°C. Les différentes combinaisons de températures sont indiquées par les panneaux roses et violets. Chaque point représente une moyenne de 3 mesures.

Cette mesure nous renseigne sur l'état de photoinhibition des feuilles, que nous pourrons par la suite comparer au contenu en pigments. Plusieurs éléments sont notables ici :

.. Lorsque le stress s'effectue à 15°C (fig 4.9-A et 4.9-B), les feuilles sont peu affectées par le traitement : d'une valeur égale à 0,8 avant le stress, le rapport Fv/Fm descend à environ 0,6 chez les 2 benoîtes d'altitude, ce qui montre une bonne résistance au stress appliqué ici. Chez l'espèce de plaine, ce même rapport atteint 0,5, mais il est nettement visible que cette chute est transitoire, et qu'après une période de récupération à l'obscurité, les feuilles recouvrent quasiment leur rendement quantique maximal initial, avec un rapport Fv/Fm dépassant 0,6 lorsque la récupération a lieu sur la glace, et atteignant 0,7 à 15°C.

.. Lorsque le stress s'effectue à une température plus basse (sur la glace, la température des feuilles atteignant 6 à 7°C, fig 4.9-C et 4.9-D), les profils des courbes changent nettement. Chez *Geum urbanum*, on assiste à une chute très importante du

rapport Fv/Fm, pouvant atteindre jusqu'à 0,2, et les feuilles sont incapables de recouvrer la valeur initiale du rapport Fv/Fm, que la récupération s'effectue à 15°C ou sur la glace. Ceci suggère donc une photoinhibition irréversible chez cette espèce, avec dans certains cas une destruction de l'appareil photosynthétique avec l'apparition de taches brunes sur les feuilles. Chez *Geum montanum*, on assiste au contraire à une photoinhibition transitoire et réversible : après une chute du rapport Fv/Fm suite au stress, atteignant des valeurs d'environ 0,5, celui-ci augmente à nouveau au cours de la récupération à l'obscurité, pour atteindre des valeurs comprises entre 0,6 et 0,7. Enfin, les feuilles de *Geum reptans* ne sont que très peu sensibles au stress appliqué et sont donc comparativement plus résistantes à la photoinhibition, avec un rapport Fv/Fm ne chutant pas à plus de 0,65 après l'exposition à la lumière.

Ces résultats sont en accord avec des études précédentes (Tcherkez *et al.*, en préparation), et illustrent la problématique de ce paragraphe : comment expliquer cette différence de résistance au sein du genre *Geum* ?

Des analyses du contenu pigmentaire de feuilles des différents *Geum* subissant des traitements stressants (non présentés ici) n'ont pas permis de conclure quant à un rôle prédominant d'un caroténoïde particulier, ou du cycle des xanthophylles, chez les *Geum* d'altitude.

2.5) Expression de PTOX chez les 3 espèces de *Geum*

Puisqu'il semble difficile d'expliquer par quel(s) mécanisme(s) les benoîtes d'altitude opèrent leur résistance à la photoinhibition (Tcherkez *et al.*, en préparation ; résultats non présentés), et puisque PTOX pourrait être une protéine impliquée dans les mécanismes de photoprotection, nous avons voulu savoir si une photoprotection importante était associée à une accumulation de PTOX chez les *Geum*.

Que peut-on observer quant à l'expression de PTOX lorsque l'on bloque le cycle des xanthophylles ? La violaxanthine dé-époxydase (VDE) qui catalyse la dé-époxydation de la violaxanthine en anthéroxanthine puis en zéaxanthine est inhibée par un traitement au DTT (Sarry *et al.*, 1994). Ainsi il est possible de bloquer l'activité de la VDE en incubant les feuilles pendant 1 nuit puis pendant un stress lumineux dans du DTT. Des essais ont été effectués pour 5mM et 30mM de DTT, et seule la plus forte concentration a permis de bloquer totalement le cycle des xanthophylles d'après les analyses de caroténoïdes que nous avons effectuées. Pour des raisons pratiques, puisque le traitement nécessitait que les feuilles soient au contact du DTT pendant le stress lumineux, ces traitements ont été effectués à 15°C sur des feuilles flottant à la surface de l'eau, et la récupération a également été effectuée à 15°C. En l'absence de DTT, ce type de traitement correspond à une situation peu stressante pour laquelle l'espèce de plaine présente peu de photoinhibition (non présenté).

La figure 4.10 présente un western blot effectué sur les feuilles ayant subi ce type de traitements, en présence de DTT. Il est important de signaler ici que le DTT est également capable d'inhiber d'autres enzymes telle que la catalase, ce qui signifie que la réaction provoquée ici par notre traitement pourrait être le résultat de multiples stress au sein de la feuille. Il est à noter que les quantités de protéines déposées ici ne sont pas

exactement identiques. Il est vrai que de nombreuses bandes contaminantes sont présentes sur le résultat de cette immunodétection, mais le western blot présenté précédemment (fig. 4.3) nous a amené à conclure que la bande correspondant à PTOX n'est pas la bande majoritaire ici. Il aurait sans doute été nécessaire d'effectuer une purification supplémentaire de l'anticorps anti-PTOX pour obtenir un résultat plus propre. Malgré les précautions qu'il est indispensable de prendre dans l'interprétation d'un tel résultat, nous pouvons néanmoins décrire les tendances qui se dégagent de cette expérience.

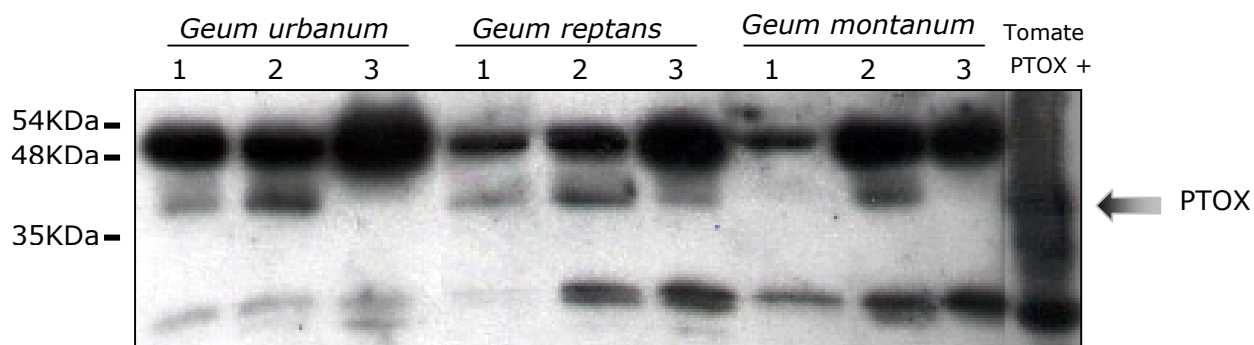


Fig 4.10: Niveau d'expression de PTOX chez les 3 espèces de *Geum* au cours des traitements visant à inhiber le cycle des xanthophylles. SDS-PAGE de protéines insolubles totales suivie d'un transfert. Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000. 1: état initial, 2: après 4h de stress lumineux en présence de 30mM de DTT, 3: après 22h de récupération.

A l'état (2), après un stress lumineux de 4h en présence de 30mM de DTT, la quantité de PTOX présente chez les 3 espèces augmente par rapport à la situation initiale, et elle baisse à nouveau après une récupération de 22h. Il semble donc que l'on retrouve ici la tendance dégagée à la figure 4.3 : la quantité de PTOX chez les *Geum* est plus importante en état de stress. Néanmoins, il n'est pas possible ici de mettre en évidence une différence entre les 3 espèces : la quantité de PTOX détectée est approximativement la même. Ainsi, s'il existe une corrélation entre l'accumulation de PTOX et l'état de stress des *Geum*, suggérant une possible participation de PTOX à un mécanisme de photoprotection, l'accumulation de PTOX ne semble pas expliquer pas la différence de résistance à la photoinhibition des benoîtes de montagne comparée à celle de la benoîte de plaine.

3) Rôle de PTOX dans la résistance à la photoinhibition de *Ranunculus glacialis*

Il existe de nombreuses stratégies utilisées par les plantes pour s'adapter aux stress environnementaux (Streb *et al.*, 1998). *Homogyne alpina* possède une catalase particulièrement stable, permettant de soutenir d'une part la photorespiration, d'autre part la détoxification des ROS (Streb *et al.*, 1997), alors que *Soldanella alpina* possède un contenu en caroténoïdes très important et un cycle des xanthophylles très actif, permettant une dissipation thermique de l'énergie très efficace (Steb *et al.*, 1997 ;

1998). Un système reposant sur PTOX en tant que valve de sécurité dans le plaste peut être envisagé également, même si chez les benoîtes, PTOX ne semble pas fortement impliquée dans les mécanismes de résistance à la photoinhibition. Des résultats préliminaires présentés aux § 1.2 et 1.3 montrent que la renoncule des glaciers présente une forte accumulation de PTOX.

3.1) Données sur la renoncule des glaciers

La renoncule des glaciers est un modèle intéressant pour étudier les mécanismes de résistance à la photoinhibition, car cette plante est directement exposée au rayonnements du soleil lorsqu'elle pousse à de très hautes altitudes, comme c'est le cas au col du Galibier. Elle présente une capacité photosynthétique importante, et peu de dommages oxydatifs en présence d'une forte luminosité (Streb *et al.*, 1997). Tout comme *Homogyne alpina* et *Soldanella alpina*, elle possède un turn-over de la catalase et de la sous-unité D1 du PSII très lent (Shang & Feierabend, 1998 ; Streb *et al.*, 1997), contrairement aux plantes non adaptées à l'altitude (Aro *et al.*, 1993 ; Feierabend *et al.*, 1992). Ainsi, ces enzymes, puisqu'elles sont peu renouvelées, doivent être efficacement protégées.

La renoncule des glaciers a un contenu en caroténoïdes faible, avec peu de xanthophylles, et la participation de son cycle des xanthophylles à sa capacité de photoprotection est peu probable. D'autre part, elle présente une sensibilité au paraquat très forte, une teneur en α -tocophérol faible et un cycle ascorbate-gluthation peu actif : la réaction de Mehler (le cycle de l'eau, cf. Introduction §1.3.3) ne peut pas non plus expliquer sa capacité de photoprotection (Streb *et al.*, 1997 ; 1998 ; Wildi, 1996).

Un autre mécanisme utilisé par les plantes pour se protéger contre une trop forte quantité d'énergie provenant de la photosynthèse est d'augmenter l'assimilation du carbone en fabriquant certains sucres : la renoncule des glaciers ne synthétise pas plus de sucres que les autres plantes, et le seul métabolite augmenté chez elle est le malate. Cependant, il semble très improbable que chez la renoncule, le malate soit une molécule puits pour les électrons de la photosynthèse (Streb *et al.*, 2003). Seule la photorespiration semble avoir une part importante dans la photoprotection de la renoncule des glaciers (Streb *et al.*, 1997 ; 1998), mais ne peut à elle seule expliquer sa résistance, d'autant que, si l'activité du PSII est très sensible à la lumière dans les thylacoïdes isolés de la renoncule, le PSII est à nouveau protégé dans les chloroplastes intacts (Streb *et al.*, 1997), suggérant la présence d'un mécanisme clef au sein même du chloroplaste.

Puisque aucune des stratégies classiques ne peut expliquer la forte résistance à la photoinhibition de la renoncule des glaciers, nous avons voulu savoir si PTOX pouvait être impliquée dans ce mécanisme.

3.2) Expression de PTOX chez les Renonculacées

La quantité de PTOX retrouvée chez la renoncule des glaciers est plus importante que chez les autres plantes alpines testées (fig. 4.3). Nous avons voulu vérifier que ce

résultat ne correspondait pas à un artéfact dû à une reconnaissance particulièrement forte de PTOX chez les Renonculacées.

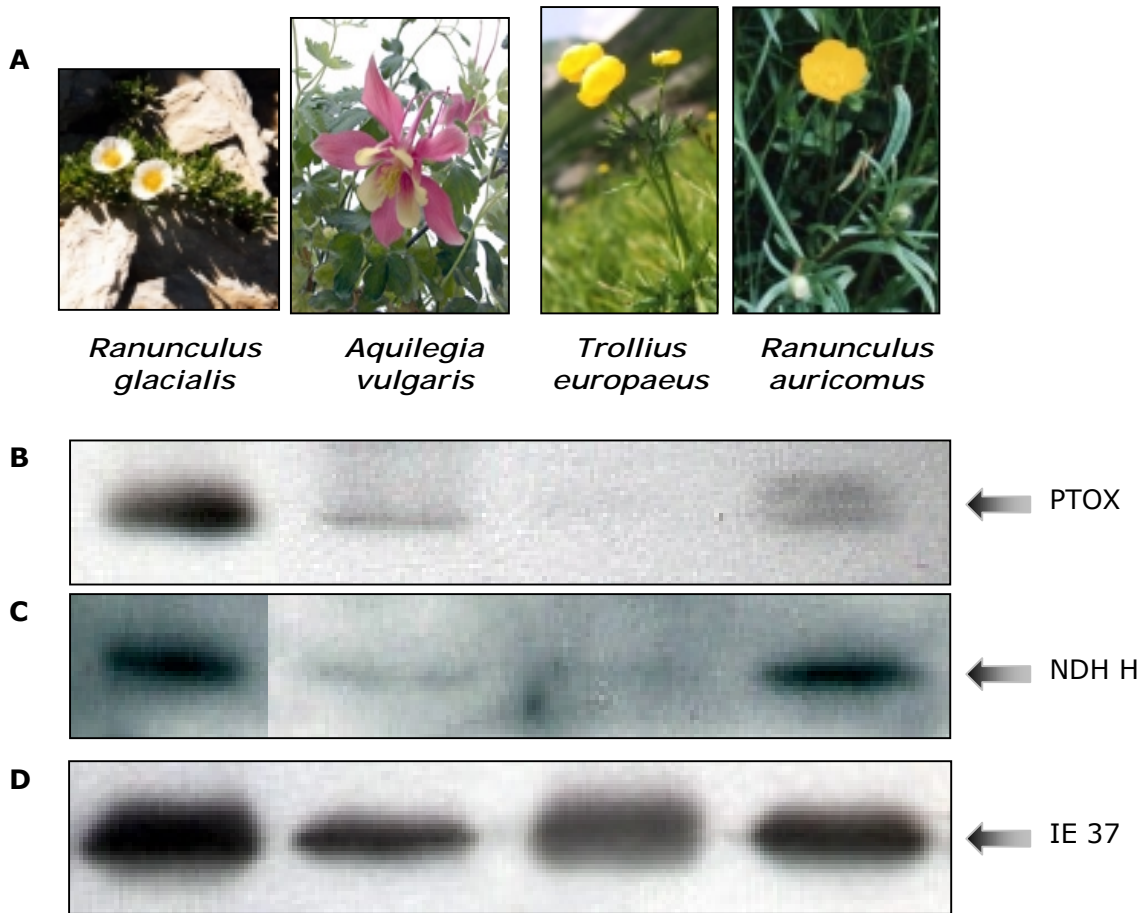


Fig 4.11: Niveau d'expression de PTOX chez différentes plantes de la famille des renonculacées (présentées en A). SDS-PAGE d'environ 30µg de protéines insolubles totales suivie d'un transfert. B: Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000. C: Immunodétection avec l'anti-NDH H au 1/1000. D: Immunodétection "contrôle de charge" avec l'anti-IE 37 au 1/150000.

La figure 4.11A présente les Renonculacées que nous avons testées: nous avons ici 2 espèces de plaine, *Ranunculus aureus* et *Aquilegia vulgaris*, et une espèce de montagne ramassée à environ 1600m d'altitude, *Trollius europaeus*. Le western blot suivant montre de façon claire un signal de détection plus fort chez la renoncule des glaciers que chez les espèces de la même famille. Il faut néanmoins souligner que PTOX est clairement détectée chez les renoncules testées (même quand elle est présente en quantité plus faible que dans la renoncule des glaciers), alors que la protéine n'est souvent pas détectable dans les mêmes conditions de préparation chez les benoîtes: il est donc possible soit que la protéine, légèrement différente chez les renonculacées, est mieux reconnue que chez les rosacées, soit que la protéine est plus abondante de façon générale chez les renonculacées.

3.3) Participation de PTOX à la dé-acclimatation chez *Ranunculus glacialis*

De façon intéressante, et contrairement à la soldanelle, qui possède les mêmes paramètres physiologiques lorsqu'elle est poussée en altitude ou dans des conditions de plaine, il semble que la renoncule se "dé-acclimate" en plaine : sa tolérance au stress lumineux chute (Streb *et al.*, 2003).

Dans ce contexte, il était alors pertinent de chercher à observer la variation de PTOX lorsqu'on cultive la renoncule des glaciers en plaine. Pour se faire, des pieds de renoncule ont été ramassés au col du Galibier, laissés en pot avec leur terre d'origine, et placés à 25°C et en lumière assez faible au laboratoire pendant 3 semaines. Une durée plus longue peut provoquer une sénescence des feuilles (Streb *et al.*, 2003).

Nous allons alors voulu comparer la quantité de PTOX retrouvée dans les feuilles. C'est ce qui est présenté sur la figure 4.16, qui montre le résultat d'un western blot à partir de protéines insolubles de renoncule.

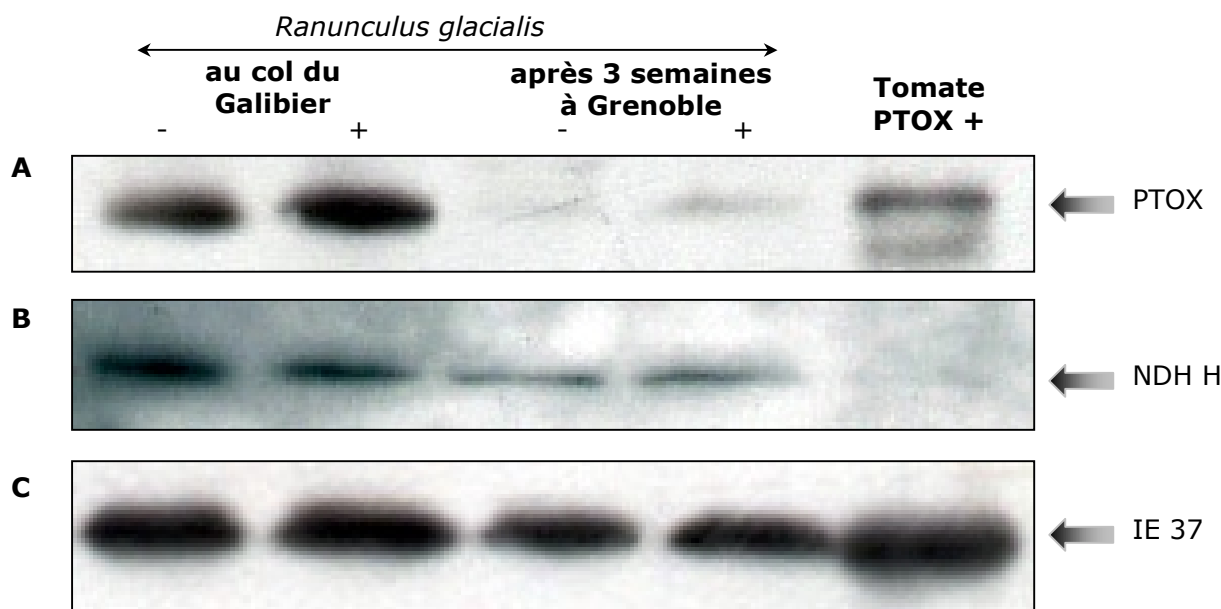


Fig 4.12: Niveau d'expression de PTOX et de NDH H chez la renoncule des glaciers suivant les conditions de vie. SDS-PAGE d'environ 30µg de protéines insolubles totales suivie d'un transfert. -: feuille en lumière faible, +: feuille en lumière forte. A: Immunodétection avec l'anti-PTOX au 1/15000. B: Immunodétection avec l'anti-NDH H au 1/1000. C: Immunodétection "contrôle de charge" avec l'anti-IE 37 au 1/150000.

Le premier résultat frappant ici est la chute très claire de la quantité de PTOX après 3 semaines de culture au laboratoire. Ainsi, alors que la plante perd une partie de ses capacités à résister à la photoinhibition (Streb *et al.*, 2003), elle perd en même temps l'énorme teneur en PTOX qui la caractérisait : les 2 phénomènes peuvent donc être corrélés. Il est également intéressant d'observer que la quantité de PTOX n'évolue pas avec l'application d'un stress lumineux : il n'y a pas de synthèse rapide de PTOX en réponse à un tel traitement. La quantité de PTOX reste importante pour les échantillons récoltés en milieu alpin naturel, et faible pour les échantillons correspondant aux plantes "dé-acclimatées". Nous avons vu précédemment que PTOX était plus fortement exprimée

en présence de lumière chez le tabac et la tomate (Rizhsky *et al.*, 2002 ; Simkin, 2002). Ici, l'observation est différente : un stress lumineux n'induit pas la néosynthèse de PTOX. Tout se passe comme si la plante possédait naturellement un niveau élevé de PTOX dans son milieu naturel et ce quelque soit la quantité de lumière reçue : il semble alors possible que la renoncule puisse réguler de façon très rapide l'activation de PTOX le moment venu, sans induire une synthèse sous l'effet d'une lumière forte.

Une hypothèse séduisante serait d'imaginer une activation de PTOX par un métabolite produit rapidement en présence de lumière, à l'image de l'activation par le pyruvate de l'AOX mitochondriale. Il est également envisageable d'émettre l'hypothèse que l'alcalinisation du stroma à la lumière conduise à une activation de PTOX (cf. chapitre 2). En effet, si nous avons jusqu'à présent été incapables de trouver une molécule capable d'activer cette enzyme dans les essais biochimiques présentés au chapitre 2, nous avons néanmoins vu que l'activité de PTOX à pH 8,5 est quasiment doublée par rapport à son activité à pH 7. Ainsi, il est possible que cette modification du pH soit la source de l'activation rapide de PTOX à la lumière. Nous espérons qu'une étude de la réaction enzymatique dans un essai *in vitro* indépendant des membranes bactériennes permettra de faire le point sur cette hypothèse. Cette même étude permettra également d'investiguer la possibilité d'une régulation de PTOX par un composé redox, un tel système pouvant par exemple reposer sur l'action de protéines type thioredoxine (Jacquot *et al.*, 2002 ; Pfanschmidt, 2003).

PTOX est une enzyme participant à la biosynthèse des caroténoïdes (cf. chapitre 3). Elle est retrouvée en faible quantité dans la majorité des plantes (cf. chapitre 1). Sa présence à un fort niveau chez la renoncule des glaciers pourrait traduire une forte synthèse de caroténoïdes, éléments clefs de la protection contre la photoinhibition. Cependant, chez cette espèce, le contenu en caroténoïdes (et notamment en β -carotène) est particulièrement faible, et ce même comparé à des espèces de plaine qui présentent généralement un plus faible teneur en caroténoïdes que les espèces d'altitude (Streb *et al.*, 1997). De même, le contenu en xanthophylles est faible comparé à d'autres plantes alpines (15% des caroténoïdes totaux contre 25% pour la soldanelle des Alpes), et si la quantité de zéaxanthine augmente au cours de la journée, il reste assez faible (5 à 20% des xanthophylles contre 30 à 50% chez la soldanelle et 30 à 40% chez les benoïtes) (Streb *et al.*, 1997). D'autre part, alors que la quantité de PTOX chute après une "dé-acclimatation" en plaine, la quantité de caroténoïdes augmente un peu (Streb *et al.*, 2003): la quantité de PTOX présente n'est donc pas du tout corrélée à la teneur en caroténoïdes, et il semble alors improbable que PTOX participe à la tolérance au stress en augmentant le contenu en caroténoïdes chez cette espèce. Ces observations rejoignent les conclusions obtenues par l'analyse du profil d'expression de PTOX chez *Arabidopsis thaliana* qui a révélé un niveau d'expression pas toujours corrélé à l'accumulation de caroténoïdes (Aluru *et al.*, 2001).

Le western blot de la figure 4.16 présente également les variations du contenu en Ndh H chez la Renoncule. Puisque PTOX et le complexe Ndh sont fonctionnellement liés dans le mécanisme de chlororespiration, nous avons voulu vérifier si ils pouvaient être régulés ou exprimés de façon corrélée ici. D'une part la quantité de Ndh H retrouvée chez la

renoncule des glaciers est importante, et supérieure à la quantité retrouvée chez d'autres renonculacées (fig 4.15). D'autre part, cette quantité diminue au cours de la "dé-acclimatation" de la renoncule des glaciers. Il est donc également possible que le complexe Ndh joue un rôle dans la capacité de résistance à la photoinhibition de la renoncule, l'hypothèse la plus directe étant une implication du flux cyclique des électrons autour du PSI permettant une protection efficace du PSI.

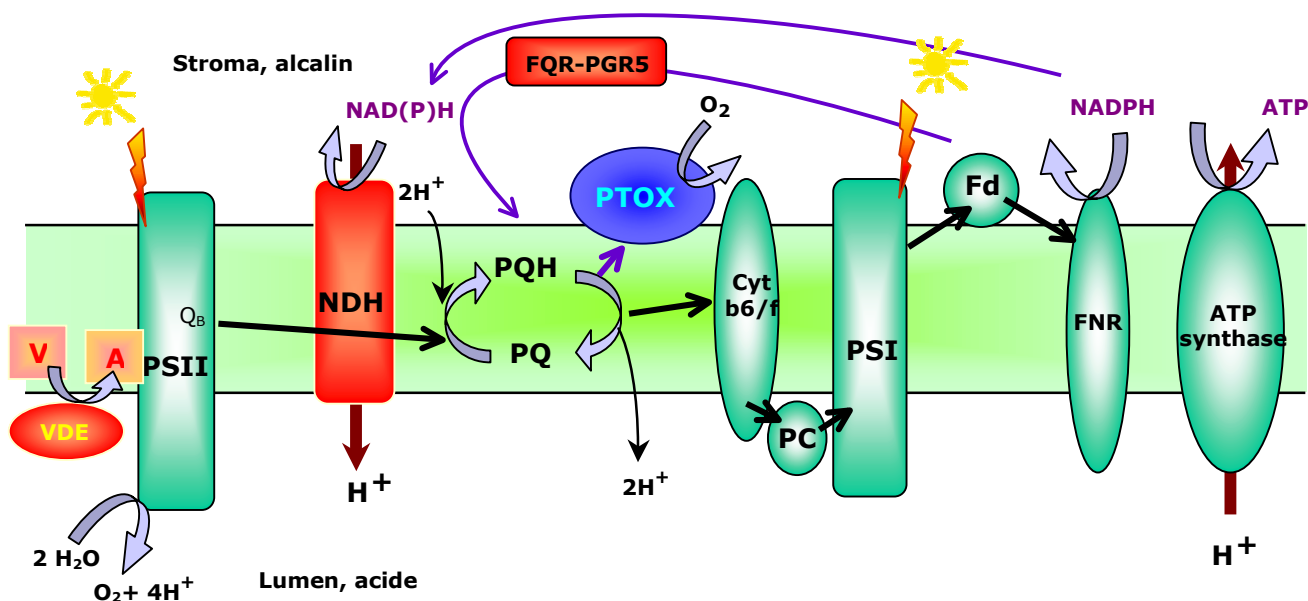


Schéma récapitulatif des différents processus proposés dans ce chapitre mis en jeu autour du transfert d'électrons linéaire de la photosynthèse pour minimiser la photoinhibition des photosystèmes chez la renoncule des glaciers. Le flux cyclique des électrons autour de PSI peut faire intervenir plusieurs voies, via le complexe NDH, la FQR et PGR5. Il permet d'entretenir le gradient de protons, maintenant l'activation de la VDE grâce à l'acidification du stroma, et la possible activation de PTOX par une alcalinisation du stroma à proximité de la membrane thylacoïdienne.

Le transport cyclique d'électrons a été proposé comme un facteur participant à la photoprotection du PSI, et indirectement du PSII (Endo *et al.*, 1999). En effet, la dérivation des électrons sur le complexe Ndh à la sortie du PSI pourrait réduire la quantité d'électrons transférés à l'O₂, réduisant de ce fait la quantité de ROS produits du côté réducteur du PSI, et le gradient de protons associé à ce mécanisme pourrait participer à maintenir un niveau de dissipation thermique au niveau du PSII élevé (Barth & Krause, 2002). L'une de nos hypothèses est également que ce gradient de protons entretenu par l'activité du complexe Ndh maintiendrait l'activation de PTOX. La mesure du flux cyclique d'électrons autour du PSI *in vivo* chez la renoncule des glaciers est l'une des prochaines étapes à envisager afin de comprendre et de soutenir cette hypothèse. Il a récemment été découvert une protéine impliquée dans une voie alternative de transfert cyclique autour du PSI chez *Arabidopsis thaliana* et permettant un transfert d'électrons entre la ferredoxine et le pool des plastoquinones (Munekage *et al.*, 2002). La voie mise en oeuvre par cette PGR5 induit une augmentation de la dissipation thermique d'énergie

via l'activation d'un transport de protons vers le lumen. Le mutant *pgr5* est hypersensible à la lumière forte et PGR5 semble essentiel pour la photoprotection du PSI. Il serait donc particulièrement intéressant d'analyser l'accumulation de cette protéine chez la renoncule des glaciers, afin de savoir si elle peut jouer un rôle similaire à celui attribué au complexe Ndh.

D'autres et nombreuses expériences chez la renoncule des glaciers seront nécessaires pour vérifier l'ébauche de mécanisme de photoprotection que nous avons décrit pour cette plante, et il serait notamment intéressant de réussir à mesurer l'activité PTOX *in organello* dans les thylacoïdes de renoncule des glaciers. De même, à l'image de la mesure de la vitesse de réoxydation de la plastoquinone suite à la réduction du pool de plastoquinone par une série de flash saturants, montrant une différence significative entre les tabacs surexprimant PTOX et les tabacs sauvages (cf. chapitre 4), il serait intéressant de réussir à montrer une différence similaire entre des renoncules acclimatées aux conditions de vie alpines, et des renoncules "dé-acclimatées" en plaine. L'hypothèse d'une implication de PTOX dans un processus photoprotection a récemment été renforcée par la mise en évidence de la possible implication de PTOX dans un mécanisme compensatoire de lutte contre les ROS chez des tabacs déficients en ascorbate peroxidase et en catalase (Rizhsky *et al.*, 2002). En effet, sa surexpression en l'absence des 2 enzymes clefs de la détoxification des ROS dans la cellule permettrait d'assurer à la plante un niveau de production de ROS faible.

CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons voulu évaluer la participation de PTOX au réseau des mécanismes de résistance au stress *via* l'utilisation de plantes alpines, possédant des capacités de photoprotection supérieures aux plantes de plaine. Chez les *Geum*, PTOX est exprimée en situation de stress important, suggérant une implication de la protéine dans les mécanismes mis en œuvre par la plante. Cette implication ne semble cependant pas être le mécanisme expliquant la très forte résistance des 2 espèces d'altitude.

Il existe de très nombreuses stratégies de photoprotection chez les plantes exposées à des conditions de vie stressantes, et chaque espèce semble avoir adopté un "cocktail" qui lui est propre. L'ingrédient majeur de ce "cocktail" chez la renoncule des glaciers pourrait être une implication de PTOX, permettant de maintenir un pool de plastoquinone dans un état peu réduit. Ceci permettrait donc d'éviter une saturation de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques conduisant à une destruction du PSII. Il est également possible que le complexe Ndh soit impliqué dans ce modèle. Si de nombreuses évidences expérimentales sont à obtenir avant de pouvoir conclure avec fermeté sur le rôle majeur de PTOX chez la renoncule des glaciers, l'ensemble des résultats obtenus ici suggèrent néanmoins que PTOX peut participer de façon générale aux différents mécanismes de photoprotection.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons tiré parti de l'expression de PTOX dans des systèmes hétérologues pour avancer dans la compréhension de la fonction et de la régulation de cette enzyme.

Nous avons ainsi montré sa fonction de plastoquinol oxydase lorsqu'elle est exprimée chez *E. coli*, ceci grâce à la mise au point d'un essai enzymatique sur des membranes bactériennes. Dans ces conditions, PTOX présente une activité augmentée en milieu alcalin, et nécessite la présence de fer comme co-facteur. L'élaboration à venir d'un test enzymatique indépendant des membranes bactériennes devrait permettre d'une part de tester la possible régulation de l'enzyme par des mécanismes redox, et sera d'autre part utilisé pour tester un plus grand nombre de composés impliqués dans le métabolisme cellulaire et susceptibles de réguler l'activité de PTOX.

La production de la protéine en système bactérien nous a également servi à obtenir un anticorps. Ceci a permis la localisation de PTOX au sein des thylacoïdes, au niveau des lamelles stromatiques.

Sa surexpression chez la tomate nous a permis de mettre en évidence une corrélation entre l'augmentation de la production de certains caroténoïdes et l'accumulation de la protéine, suggérant une régulation positive de la voie de biosynthèse des caroténoïdes par PTOX, ce qui est cohérent avec le blocage de cette même voie en son absence.

La surexpression de PTOX chez le tabac a permis de mettre en évidence son rôle dans la chlororespiration, les tabacs PTOX+ présentant une accélération de la réduction non photochimique du pool de plastoquinone, la protéine surexprimée dirigeant une quantité significative d'électrons vers l'O₂, empêchant ainsi la sur-réduction du pool de plastoquinone.

Enfin, nous avons cherché à montrer l'implication de PTOX dans la résistance à la photoinhibition et de façon plus générale dans un mécanisme de résistance au stress *via* une approche impliquant l'utilisation de plantes alpines. Celle-ci nous a permis de découvrir la possibilité d'un rôle pour PTOX dans la photoprotection de la renoncule des glaciers. La réelle implication de PTOX chez cette espèce devra être validée par de futures études nécessitant la mise en évidence de la fonction de la protéine *in vivo*.

La liste des rôles joués par PTOX dans la physiologie de la plante à présent est-elle complète ? Avons-nous été exhaustifs et avons-nous ouvert toutes les pistes d'études possibles ? Il est probable que ces transferts d'électrons alternatifs dans lesquels PTOX est impliquée puissent être regroupés dans un mécanisme plus global et régulé à un niveau supérieur.

En effet, nos travaux présentés dans ce manuscrit ainsi que différentes études récentes semblent indiquer que PTOX est impliquée dans la régulation de l'état redox du plaste et dans la limitation de la production de ROS (Rizhsky *et al.* 2002 ; chapitres 3 et 4). La production de ROS et l'état redox du pool de plastoquinone sont considérés comme étant à la base de la communication entre le plaste et le noyau (Allen, 1993 ; Pfannschmidt, 2003). D'autre part, le mutant *immutans* a toujours été décrit comme déficient dans une

signalisation du plaste vers le noyau (Rodermel, 2002 ; Wetzler *et al.*, 1994), et le développement perturbé des feuilles de ce mutant suggère une effective participation de PTOX à cette communication (Aluru *et al.*, 2001).

Un concept émergent de rôle plus intégré que celui d'une simple "valve de sécurité" pour l'AOX a récemment été décrit (Hansen *et al.*, 2002 ; Moore *et al.*, 2002). L'AOX n'est alors plus considérée comme une protéine permettant une réponse rapide à une augmentation du niveau énergétique de la cellule, mais plutôt comme une partie du système de régulation de l'homéostasie cellulaire contrôlée par la mitochondrie, permettant une stricte régulation du potentiel de phosphorylation au sein de la cellule, qui lui même dirige le taux de croissance de la plante *via* une implication du métabolisme anaérobie (Hansen *et al.*, 2002). Autrement dit, l'AOX participe à l'optimisation de la croissance de la plante, à l'interface entre un rôle de détection et de la régulation du niveau énergétique de la cellule.

Or, dans une cellule végétale, le potentiel de phosphorylation dépend également de l'activité plastidiale *via* la photosynthèse. De plus, l'hypothèse que le développement et/ou le statut métabolique du plaste joue un rôle dans la régulation de la différenciation cellulaire ou dans la morphogenèse de la feuille a précédemment été avancée (Rodermel, 2001). PTOX pourrait alors posséder une fonction analogue à celle décrite ici pour l'AOX, permettant d'une part d'informer le noyau afin qu'il soit capable d'intégrer les états d'énergie des plastes dans la cellule, et d'autre part, dans une régulation feedback, de coordonner l'activité photosynthétique des plastes aux besoins de la cellule. Ainsi la communication entre les organelles et le noyau ne se limiterait pas uniquement à coordonner l'expression des différents génomes, mais serait un régulateur central et global des voies contrôlant le métabolisme cellulaire et le développement de la plante.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Affourtit C, Krab K, Moore AL (2001) Control of plant mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* **1504**: 58-69

Affourtit C, Albury MS, Crichton PG, Moore AL (2002) Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett* **510**: 121-126

Ajayi WU, Chaudhuri M, Hill GC (2002) Site-directed mutagenesis reveals the essentiality of the conserved residues in the putative diiron active site of the trypanosome alternative oxidase. *J Biol Chem* **277**: 8187-8193

Alba R, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH (2000) Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiol* **123**: 363-370

Al-Babili S, Hugueney P, Schledz M, Welsch R, Frohnmeier H, Laule O, Beyer P (2000) Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Lett* **485**: 168-172

Albrecht M, Klein A, Hugueney P, Sandmann G, Kuntz M (1995) Molecular cloning and functional expression in *E. coli* of a novel plant enzyme mediating zeta-carotene desaturation. *FEBS Lett* **372**: 199-202

Albury MS, Affourtit C, Crichton PG, Moore AL (2002) Structure of the plant alternative oxidase. Site-directed mutagenesis provides new information on the active site and membrane topology. *J Biol Chem* **277**: 1190-1194

Allen JF (1993) Redox control of transcription: sensors, response regulators, activators and repressors. *FEBS Lett* **332**: 203-207

Allen JF (1993) Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol* **165**: 609-631

Allen JF, Alexciev K, Hakansson G (1995) Photosynthesis. Regulation by redox signalling. *Curr Biol* **5**: 869-872

Allen DJ, Ort DR (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Sci* **6**: 36-42

Allen JF, Forsberg J (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci* **6**: 317-326

Aluru MR, Bae H, Wu D, Rodermeier SR (2001) The *Arabidopsis thaliana* *immutans* mutation affects plastid differentiation and the morphogenesis of white and green sectors in variegated plants. *Plant Physiol* **127**: 67-77

Andersson ME, Nordlund P (1999) A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett* **449**: 17-22

Anraku Y (1988) Bacterial Electron Transport Chains. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 101-132

Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* **1143**: 113-134

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase - A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* **85**: 235-241

Asada K (1999) THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 601-639

Aubert S, Bligny R, Day DA, Whelan J, Douce R (1997) Induction of alternative oxidase synthesis by herbicides inhibiting branched-chain amino acid synthesis. *Plant J* **11**: 649-657

Avissar YJ, Beale SI (1990) Cloning and expression of a structural gene from *Chlorobium vibrioforme* that complements the hemA mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 1656-1659

Baena-Gonzalez E, Allahverdiyeva Y, Svab Z, Maliga P, Josse EM, Kuntz M, Maenpaa P, Aro EM (2003) Deletion of the tobacco plastid psbA gene triggers an upregulation of the thylakoid-associated NAD(P)H dehydrogenase complex and the plastid terminal oxidase (PTOX). *Plant J* **35**: 704-716

Bahr JT, Bonner WD, Jr. (1973) Cyanide-insensitive respiration. II. Control of the alternate pathway. *J Biol Chem* **248**: 3446-3450

Barth C, Krause GH (2002) Study of tobacco transformants to assess the role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection of photosystems I and II. *Planta* **216**: 273-279

Bartley GE, Viitanen PV, Pecker I, Chamovitz D, Hirschberg J, Scolnik PA (1991) Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6532-6536

Bartley GE, Viitanen PV, Bacot KO, Scolnik PA (1992) A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *J Biol Chem* **267**: 5036-5039

Bartley GE, Scolnik PA, Giuliano G (1994) Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 287-301

Bendall DS, Manasse RS (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim Biophys Acta* **1229**: 23-38

Benichou P, Calvayrac R, Claisse M (1988) Induction by antimycine A of a cyanide-resistant respiration in heterotrophic *Euglena gracilis*: effects on growth, respiration and protein biosynthesis. *Planta* **175**: 23-32

Bennoun P (1982) A respiratory chain in the thylakoid membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Prog Clin Biol Res* **102 Pt B**: 291-298

Bennoun P (2001) Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1506**: 133-142

Berthold DA (1998) Isolation of mutants of the *Arabidopsis thaliana* alternative oxidase (ubiquinol:oxygen oxidoreductase) resistant to salicylhydroxamic acid. *Biochim Biophys Acta* **1364**: 73-83

Berthold DA, Andersson ME, Nordlund P (2000) New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1460**: 241-254

Berthold DA, Voevodskaya N, Stenmark P, Graslund A, Nordlund P (2002) EPR studies of the mitochondrial alternative oxidase. Evidence for a diiron carboxylate center. *J Biol Chem* **277**: 43608-43614

Berthold DA, Stenmark P (2003) Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 497-517

Beyer P, Mayer M, Kleinig H (1989) Molecular oxygen and the state of geometric isomerism of intermediates are essential in the carotene desaturation and cyclization reactions in daffodil chromoplasts. *Eur J Biochem* **184**: 141-150

Bielski BH (1978) Reevaluation of the spectral and kinetic properties of OH_2 and O_2^- free radicals. *Photochem Photobiol* **28**: 645-649

Bishop NI, Urbig T, Senger H (1995) Complete separation of the beta,epsilon- and beta,beta-carotenoid biosynthetic pathways by a unique mutation of the lycopene cyclase in the green alga, *Scenedesmus obliquus*. *FEBS Lett* **367**: 158-162

Bouvier F, D'Harlingue A, Backhaus RA, Kumagai MH, Camara B (2000) Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur J Biochem* **267**: 6346-6352

Britton G (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb J* **9**: 1551-1558

Buchanan BB (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 341-374

Burrows PA, Sazanov LA, Svab Z, Maliga P, Nixon PJ (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *Embo J* **17**: 868-876

Camara B, Hugueney P, Bouvier F, Kuntz M, Moneger R (1995) Biochemistry and molecular biology of chromoplast development. *Int Rev Cytol* **163**: 175-247

Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M (1999) Mutations in the Arabidopsis gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* **11**: 57-68

Carol P, Kuntz M (2001) A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci* **6**: 31-36

Chivasa S, Carr JP (1998) Cyanide restores N gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. *Plant Cell* **10**: 1489-1498

Chung SC, Rédei GP (1974) An anomaly of the genetic regulation of the de novo pyrimidine pathway in the plant Arabidopsis. *Biochem Genet* **11**: 441-453

Chung SC, Rédei GP, White JA (1974) Plastid differentiation on 6-azauracil media. *Experientia* **30**: 92-94

Corona V, Aracri B, Kosturkova G, Bartley GE, Pitto L, Giorgetti L, Scolnik PA, Giuliano G (1996) Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant J* **9**: 505-512

Cournac L, Josse EM, Joët T, Rumeau D, Redding K, Kuntz M, Peltier G (2000) Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 1447-1454

Cournac L, Redding K, Ravenel J, Rumeau D, Josse EM, Kuntz M, Peltier G (2000) Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J Biol Chem* **275**: 17256-17262

Cramer WA, Soriano GM, Ponomarev M, Huang D, Zhang H, Martinez SE, Smith JL (1996) SOME NEW STRUCTURAL ASPECTS AND OLD CONTROVERSIES CONCERNING THE CYTOCHROME b6f COMPLEX OF OXYGENIC PHOTOSYNTHESIS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 477-508

Cruz-Hernandez A, Gomez-Lim MA (1995) Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica*, L.) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta* **197**: 569-576

Cunningham FX, Jr., Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E (1996) Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**: 1613-1626

Cunningham FX, Jr., Gantt E (1998) GENES AND ENZYMES OF CAROTENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 557-583

Day DA, Millar AH, Wiskich JT, Whelan J (1994) Regulation of Alternative Oxidase Activity by Pyruvate in Soybean Mitochondria. *Plant Physiol* **106**: 1421-1427

Day DA, Whelan J, Millar AH, Siedow JN, Wiskich JT (1995) Regulation of alternative oxidase in plant and fungi. *Aust J Plant Physiol* **22**: 497-509

de Kok LJ, Oosterhuis FA (1983) Effect of frost hardening and salinity on glutathione and sulfhydryl levels and on glutathione reductase activity in spinach leaves. *Physiol Plant* **58**: 47-51

Demmig-Adams B, Adams WW, 3rd (1992) Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 599-626

Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams WW, 3rd (1996) Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *Faseb J* **10**: 403-412

Demmig-Adams B, Adams WW, 3rd (2000) Harvesting sunlight safely. *Nature* **403**: 371, 373-374

Deruère J, Romer S, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kuntz M, Camara B (1994) Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell* **6**: 119-133

Djajanegara I, Holtzapffel R, Finnegan PM, Hoefnagel MH, Berthold DA, Wiskich JT, Day DA (1999) A single amino acid change in the plant alternative oxidase alters the specificity of organic acid activation. *FEBS Lett* **454**: 220-224

Dry IB, Moore AL, Day DA, Wiskich JT (1989) Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: nonlinear relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool. *Arch Biochem Biophys* **273**: 148-157

Dupuis A, Prieur I, Lunardi J (2001) Toward a characterization of the connecting module of complex I. *J Bioenerg Biomembr* **33**: 159-168

Elthon TE, McIntosh L (1987) Identification of the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8399-8403

Elthon TE, Nickels RL, McIntosh L (1989) Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol* **89**: 1311-1317

Endo T, Shikanai T, Takabayashi A, Asada K, Sato F (1999) The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection. *FEBS Lett* **457**: 5-8

Eraso JM, Kaplan S (1994) *prpA*, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **176**: 32-43

Eraso JM, Kaplan S (1996) Complex regulatory activities associated with the histidine kinase PrrB in expression of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **178**: 7037-7046

Escoubas JM, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG (1995) Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10237-10241

Ewy RG, Dilley RA (2000) Distinguishing between luminal and localized proton buffering pools in thylakoid membranes. *Plant Physiol* **122**: 583-596

Feierabend J, Schaan C, Hertwig B (1992) Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiol* **100**: 1554-1561

Finazzi G, Barbagallo RP, Bergo E, Barbato R, Forti G (2001) Photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* in State 1 and State 2: damages to the photosynthetic apparatus under linear and cyclic electron flow. *J Biol Chem* **276**: 22251-22257

Fisher N, Rich PR (2000) A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J Mol Biol* **296**: 1153-1162

Forsberg J, Rosenquist M, Frayse L, Allen JF (2001) Redox signalling in chloroplasts and mitochondria: genomic and biochemical evidence for two-component regulatory systems in bioenergetic organelles. *Biochem Soc Trans* **29**: 403-407

Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* **92**: 696-717

Foyer CH (1997) Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. *In* CSHL Press, ed, *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses.*, New York, pp 587-621

Frank HA, Bautista JA, Josue JS, Young AJ (2000) Mechanism of nonphotochemical quenching in green plants: energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin. *Biochemistry* **39**: 2831-2837

Friedrich T, Steinmuller K, Weiss H (1995) The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett* **367**: 107-111

Fryer MJ (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Physiol* **15**: 381-392

Genevois ML (1929) *Rev Gén Bot* **41**: 252-271

Gilmore AM, Ball MC (2000) Protection and storage of chlorophyll in overwintering evergreens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11098-11101

Giovannoni J (2001) Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 725-749

Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* **5**: 379-387

Gonzalez-Meler MA, Ribas-Carbo M, Giles L, Siedow JN (1999) The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol* **120**: 765-772

Guedeney G, Corneille S, Cuine S, Peltier G (1996) Evidence for an association of ndh B, ndh J gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Lett* **378**: 277-280

Hakansson G, Allen JF (1995) Histidine and tyrosine phosphorylation in pea mitochondria: evidence for protein phosphorylation in respiratory redox signalling. *FEBS Lett* **372**: 238-242

Hansen LD, Church JN, Matheson S, McCarlie VW, Thygerson T, Criddle RS, Smith BN (2001) Kinetics of plant growth and metabolism. *Thermochim. Acta* **388**: 415-425

Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Havaux M (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci* **3**: 147-151

Havaux M, Niyogi KK (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8762-8767

Havaux M, Bonfils JP, Lutz C, Niyogi KK (2000) Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1* Arabidopsis mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol* **124**: 273-284

Hiser C, Kapranov P, McIntosh L (1996) Genetic modification of respiratory capacity in potato. *Plant Physiol* **110**: 277-286

Hoefnagel MH, Millar AH, Wiskich JT, Day DA (1995) Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **318**: 394-400

Hoefnagel MH, Rich PR, Zhang QS, Wiskich JT (1997) Substrate kinetics of the plant mitochondrial alternative oxidase and the effects of pyruvate. *Plant Physiol* **115**: 1145-1153

Hoefnagel MH, Wiskich JT (1998) Activation of the plant alternative oxidase by high reduction levels of the Q-pool and pyruvate. *Arch Biochem Biophys* **355**: 262-270

Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, and Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* **303**: 179-180

Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) REGULATION OF LIGHT HARVESTING IN GREEN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 655-684

Horvath EM, Peter SO, Joet T, Rumeau D, Cournac L, Horvath GV, Kavanagh TA, Schafer C, Peltier G, Medgyesy P (2000) Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol* **123**: 1337-1350

Hossain M, Asada K (1984) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: Its protection by ascorbate. *Plant Cell Physiol* **25**: 1285-1295

Hossain M, Nakano K, Asada K (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplast and its participation in the regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol* **61**: 385-395

Huq S, Palmer J (1978) Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. *FEBS Lett* **96**: 252-256

Hurkman WJ, Tanaka CK (1986) Solubalisation of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol* **81**: 802-806

Hurry VM, Strand A, Tobiaeson M, Gardestrom P, Öquist G (1995) Cold Hardening of Spring and Winter Wheat and Rape Results in Differential Effects on Growth, Carbon Metabolism, and Carbohydrate Content. *Plant Physiol* **109**: 697-706

Igo MM, Slauch JM, Silhavy TJ (1990) Signal transduction in bacteria: kinases that control gene expression. *New Biol* **2**: 5-9

Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* **27**: 325-333

Jacquot JP, Gelhaye E, Rouhier N, Corbier C, Didierjean C, Aubry A (2002) Thioredoxins and related proteins in photosynthetic organisms: molecular basis for thiol dependent regulation. *Biochem Pharmacol* **64**: 1065-1069

Joët T, Cournac L, Horváth EM, Medgyesy P, Peltier G (2001) Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene.

Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I. *Plant Physiol* **125**: 1919-1929

Joët T (2001) Implication d'un complexe NAD(P)H deshydrogenase et d'une oxydase terminale chloroplastiques dans la photosynthèse et la chlororespiration. Thèse de doctorat. Université des sciences et techniques du Languedoc, Montpellier

Joët T, Cournac L, Peltier G, Havaux M (2002) Cyclic electron flow around photosystem I in C(3) plants. In vivo control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex. *Plant Physiol* **128**: 760-769

Joët T, Genty B, Josse EM, Kuntz M, Cournac L, Peltier G (2002) Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco. *J Biol Chem* **277**: 31623-31630

Jones CW (1982) Bacterial respiration and photosynthesis, Ed Thomas Nelson and sons Ltd, Walton-on-Thames

Joshi HM, Tabita FR (1996) A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14515-14520

Josse EM, Simkin AJ, Gaffé J, Labouré AM, Kuntz M, Carol P (2000) A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol* **123**: 1427-1436

Josse EM, Alcaraz JP, Labouré AM, Kuntz M (2003) In vitro characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX). *Eur J Biochem* **270**: 3787-3794

Kamata H, Hirata H (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11**: 1-14

Kapulnik Y, Yalpani N, Raskin I (1992) Salicylic acid induces cyanide resistant respiration in tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiol* **100**: 1921-1926

Kleinig H (1989) The Role Of Plastids In Isoprenoid Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 39-59

Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll Fluorescence And Photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 313-349

Kumar AM, Söll D (1992) Arabidopsis alternative oxidase sustains *Escherichia coli* respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10842-10846

Kuntz M, Camara B, Weil JH, Schantz R (1992) The psbL gene from bell pepper (*Capsicum annuum*): plastid RNA editing also occurs in non-photosynthetic chromoplasts. *Plant Mol Biol* **20**: 1185-1188

Kuntz M, Chen HC, Simkin AJ, Römer S, Shipton CA, Drake R, Schuch W, Bramley PM (1998) Upregulation of two ripening-related genes from a non-climacteric plant (pepper) in a transgenic climacteric plant (tomato). *Plant J.* **13**: 351-361

Labouré AM (1986) Désamination oxydative des L-aminoacides chez *Proteus mirabilis*. Thèse d'état. Université scientifique et médicale de Grenoble, Grenoble

Lam E, Pontier D, del Pozo O (1999) Die and let live - programmed cell death in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 502-507

Lamarck JB (1815) *Flore Fr* **3**: 151

Leif H, Sled VD, Ohnishi T, Weiss H, Friedrich T (1995) Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**: 538-548

Leipner J, Stamp P, Fracheboud Y (2000) Artificially increased ascorbate content affects zeaxanthin formation but not thermal energy dissipation or degradation of antioxidants during cold-induced photooxidative stress in maize leaves. *Planta* **210**: 964-969

Li XP, Björkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**: 391-395

Lindahl M, Yang DH, Andersson B (1995) Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur J Biochem* **231**: 503-509

Long SP, Humphries S, Falkowski PG (1994) Photoinhibition of Photosynthesis in Nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 633-661

Longo VD, Gralla EB, Valentine JS (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem* **271**: 12275-12280

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275

Mackenzie S, McIntosh L (1999) Higher plant mitochondria. *Plant Cell* **11**: 571-586

Manac'h N, Kuntz M (1999) Stress induction of a nuclear gene encoding for a plastid protein is mediated by photo-oxidative events. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 859-868

Mansfield JW (1983) Antimicrobial compounds. *In* J Callow, ed, *Biochemical Plant Pathology*. Wiley, London, pp 237-265

Manuel N, Cornic G, Aubert S, Choler P, Bligny R, Heber U (1999) Protection against photoinhibition in the alpine plant *Geum montanum*. *Oecologia* **119**: 149-158

Martin W, Herrmann RG (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* **118**: 9-17

Maxwell DP, Laudenbach DE, Huner N (1995) Redox Regulation of Light-Harvesting Complex II and cab mRNA Abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* **109**: 787-795

Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8271-8276

Maxwell DP, Nickels R, McIntosh L (2002) Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J* **29**: 269-279

Mayer M, Beyer P, Kleinig H (1990) Quinone compounds are able to replace molecular oxygen as terminal electron acceptor in phytoene desaturation in chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus* L. *Eur J Biochem* **191**: 359-363

- Mayer M, Nievelstein V, Beyer P** (1992) Purification and characterization of a NADPH dependent oxidoreductase from chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus* a redox-mediator possibly involved in carotene desaturation. *Plant Physiol Biochem* **30**: 389-398
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055
- McIntosh L** (1994) Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol* **105**: 781-786
- Meeuse BJD** (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Annu Rev Plant Physiol* **26**: 117-126
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A** (1997) A new model system for tomato genetics. *Plant J* **12**: 1465-1472
- Millar AH, Wiskich JT, Whelan J, Day DA** (1993) Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* **329**: 259-262
- Millar AH, Day DA** (1996) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* **398**: 155-158
- Millenaar FF, Benschop JJ, Wagner AM, Lambers H** (1998) The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. *Plant Physiol* **118**: 599-607
- Millenaar FF, Gonzalez-Meler MA, Fiorani F, Welschen R, Ribas-Carbo M, Siedow JN, Wagner AM, Lambers H** (2001) Regulation of alternative oxidase activity in six wild monocotyledonous species. An in vivo study at the whole root level. *Plant Physiol* **126**: 376-387
- Millenaar FF, Gonzalez-Meler MA, Siedow JN, Wagner AM, Lambers H** (2002) Role of sugars and organic acids in regulating the concentration and activity of the alternative oxidase in *Poa annua* roots. *J Exp Bot* **53**: 1081-1088
- Minagawa N, Koga S, Nakano M, Sakajo S, Yoshimoto A** (1992) Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett* **302**: 217-219
- Miyake C, Asada K** (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary photooxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol* **33**: 541-553
- Miyake C, Asada K** (1994) Ferredoxin dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol* **35**: 539-549
- Møller IM** (2001) PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 561-591
- Moore AL, Dry IB, Wiskich JT** (1988) Measurement of the redox state of the ubiquinone pool in plant mitochondria. *FEBS Lett* **235**: 76-80
- Moore AL, Siedow JN** (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1059**: 121-140

Moore AL, Umbach AL, Siedow JN (1995) Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site. *J Bioenerg Biomembr* **27**: 367-377

Moore AL, Albury MS, Crichton PG, Affourtit C (2002) Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends Plant Sci* **7**: 478-481

Muller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* **125**: 1558-1566

Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis. *Cell* **110**: 361-371

Murphy AM, Chivasa S, Singh DP, Carr JP (1999) Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci* **4**: 155-160

Nievelstein V, Vandekerchove J, Tadros MH, Lintig JV, Nitschke W, Beyer P (1995) Carotene desaturation is linked to a respiratory redox pathway in *Narcissus pseudonarcissus* chromoplast membranes. Involvement of a 23-kDa oxygen-evolving-complex-like protein. *Eur J Biochem* **233**: 864-872

Niki E, Saito T, Kawakami A, Kamiya Y (1984) Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J Biol Chem* **259**: 4177-4182

Niyogi KK, Bjorkman O, Grossman AR (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14162-14167

Niyogi KK (1999) PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 333-359

Niyogi KK (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 455-460

Norris SR, Barrette TR, DellaPenna D (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**: 2139-2149

Oelmüller R (1989) Photooxidative destruction of chloroplasts and its effects on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels. *Photochem Photobiol* **49**: 229-239

O'Gara JP, Eraso JM, Kaplan S (1998) A redox-responsive pathway for aerobic regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **180**: 4044-4050

Oh JI, Kaplan S (1999) The cbb3 terminal oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: structural and functional implications for the regulation of spectral complex formation. *Biochemistry* **38**: 2688-2696

Oh JI, Kaplan S (2000) Redox signaling: globalization of gene expression. *Embo J* **19**: 4237-4247

Oh JI, Eraso JM, Kaplan S (2000) Interacting regulatory circuits involved in orderly control of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **182**: 3081-3087

- Öquist G, Hurry VM, Huner N** (1993) Low-Temperature Effects on Photosynthesis and Correlation with Freezing Tolerance in Spring and Winter Cultivars of Wheat and Rye. *Plant Physiol* **101**: 245-250
- Ordog SH, Higgins VJ, Vanlerberghe GC** (2002) Mitochondrial alternative oxidase is not a critical component of plant viral resistance but may play a role in the hypersensitive response. *Plant Physiol* **129**: 1858-1865
- Packer JE, Slater TF, Willson RL** (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **278**: 737-738
- Paul MJ, Foyer CH** (2001) Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot* **52**: 1383-1400
- Pelmont J** (1993) Bactéries et environnement - Adaptations physiologiques. Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble
- Peltier G, Cournac L** (2002) Chlororespiration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **53**: 523-550
- Peters JL, Szell M, Kendrick RE** (1998) The expression of light-regulated genes in the high-pigment-1 mutant of tomato. *Plant Physiol* **117**: 797-807
- Pfannschmidt T** (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci* **8**: *in press*
- Plaxton WC** (1996) The organisation and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 185-214
- Polle A** (1997) Defense against photooxidative damage in plants. *In* CSHL Press, ed, *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, New York, pp 623-666
- Prieur I, Lunardi J, Dupuis A** (2001) Evidence for a quinone binding site close to the interface between NUOD and NUOB subunits of Complex I. *Biochim Biophys Acta* **1504**: 173-178
- Prieur-Lavoué I** (2002) Localisation du site de fixation des quinones et des inhibiteurs de la NADH:ubiquinone oxydoreductase chez *Rhodobacter capsulatus*. thèse de doctorat. Université Joseph Fourier, Grenoble
- Ravenel J, Peltier G, Havaux M** (1994) The cyclic electron pathways around photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii* as determined in vivo by photoacoustic measurements of energy storage. *Planta* **193**: 251-259
- Rédei GP** (1963) Somatic instability caused by a cysteine-sensitive gene in Arabidopsis. *Science* **139**: 767-769
- Rédei GP** (1967a) Biochemical aspects of a genetically determined variegation in Arabidopsis. *Genetics* **56**: 434-443
- Rédei GP** (1967b) Suppression of a genetic variegation by 6-azapyrimidine. *J Hered* **58**: 229-235
- Rédei GP** (1967c) X-ray induced phenotypic reversion in Arabidopsis. *Radiation Bot* **7**: 401-407
- Rédei GP** (1975) Arabidopsis as a genetic tool. *Annu Rev Genet* **9**: 111-127

Rhoads DM, McIntosh L (1992) Salicylic Acid Regulation of Respiration in Higher Plants: Alternative Oxidase Expression. *Plant Cell* **4**: 1131-1139

Rhoads DM, McIntosh L (1993) The salicylic acid-inducible alternative oxidase gene *aox1* and genes encoding pathogenesis-related proteins share regions of sequence similarity in their promoters. *Plant Mol Biol* **21**: 615-624

Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JN (1998) Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J Biol Chem* **273**: 30750-30756

Ribas-Carbo M, Wiskich JT, Berry JA, Siedow JN (1995) Ubiquinone redox behavior in plant mitochondria during electron transport. *Arch Biochem Biophys* **317**: 156-160

Ribas-Carbo M, Aroca R, Gonzalez-Meler MA, Irigoyen JJ, Sanchez M (2000) The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize differing in chilling sensitivity. *Plant Physiol* **122**: 199-204

Rich P (1978) Quinol oxidation in *Arum maculatum* mitochondria and its application to the assay, solubilization and partial purification of the alternative oxidase. *FEBS Lett* **96**: 252-256

Richter C, Schweitzer M (1997) Oxidative stress in mitochondria. In CSHL Press, ed, *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses.*, New York, pp 169-200

Rissler JF, Millar RL (1977) Contribution of a cyanide-insensitive alternate respiratory system to increases in formamide hydrolase activity and to growth in *Stemphylium loti* in vitro. *Plant Physiol* **60**: 857-861

Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inze D, Mittler R (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J* **32**: 329-342

Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inze D, Mittler R (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J* **32**: 329-342

Röbbelen G (1968) Genbedingte Rotlicht-Empfindlichkeit der Chloroplastendifferenzierung bei Arabidopsis (Gene-dependent red-light sensibility during chloroplast differentiation in Arabidopsis). *Planta* **80**: 237-254

Robson CA, Vanlerberghe GC (2002) Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiol* **129**: 1908-1920

Rodermel S (2001) Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci* **6**: 471-478

Rodermel S (2002) Arabidopsis variegation mutants. *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists

- Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahn H** (1996) Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 2564-2566
- Ruelland E, Miginiac-Maslow M** (1999) Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends Plant Sci* **4**: 136-141
- Sakajo S, Minagawa N, Komiyama T, Yoshimoto A** (1991) Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *Biochim Biophys Acta* **1090**: 102-108
- Salisbury FB, Ross CW** (1992) *Plant physiology* 4th edition. Wadsworth publishing company, Belmont, California
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*.
- Sandmann G** (1994) Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur J Biochem* **223**: 7-24
- Sarry JE, Montillet JL, Sauvaire Y, Havaux M** (1994) The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis. *FEBS Lett* **353**: 147-150
- Sasarman A, Surdeanu M, Horodniceanu T** (1968) Locus determining the synthesis of delta-aminolevulinic acid in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **96**: 1882-1884
- Sauge-Merle S** (1998) La ribonucléase réductase d'*A. thaliana*: surexpression, purification et caractérisation de ses deux sous-unités. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier, Grenoble
- Savitch LV, Barker-Astrom J, Ivanov AG, Hurry V, Oquist G, Huner NP, Gardestrom P** (2001) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* results in incomplete recovery of photosynthetic capacity, associated with an increased reduction of the chloroplast stroma. *Planta* **214**: 295-303
- Sazanov LA, Burrows PA, Nixon PJ** (1998) The plastid ndh genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1319-1324
- Schonbaum GR, Bonner WD, Jr., Storey BT, Bahr JT** (1971) Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol* **47**: 124-128
- Schöner S, Krause GR** (1990) Protective system against active oxygen species in spinach: response to cold acclimatation in excess light. *Planta* **180**: 383-389
- Schulz A, Ort O, Beyer P, Kleinig H** (1993) SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett* **318**: 162-166
- Schwartz RM, Dayhoff MO** (1978) Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science* **199**: 395-403
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JA, McCarty DR** (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**: 1872-1874

- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JA** (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J Biol Chem* **276**: 25208-25211
- Scolnik PA, Hinton P, Greenblatt IM, Giuliano G, Delanoy MR, Spector DL, Pollock D** (1987) Somatic instability of carotenoid biosynthesis in the tomato *ghost* mutant and its effect on plastid development. *Planta* **171**: 11-18
- Sen CK, Packer L** (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* **10**: 709-720
- Shang W, Feierabend J** (1998) Slow turnover of the D1 reaction center protein of photosystem II in leaves of high mountain plants. *FEBS Lett* **425**: 97-100
- Shikanai T, Endo T, Hashimoto T, Yamada Y, Asada K, Yokota A** (1998) Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9705-9709
- Siedow JN, Girvin ME** (1980) Alternative respiratory pathway: its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. *Plant Physiol* **65**: 669-674
- Siedow JN, Bickett DM** (1981) Structural features required for inhibition of cyanide-insensitive electron transfer by propyl gallate. *Arch Biochem Biophys* **207**: 32-39
- Siedow JN, Moore AL** (1993) A kinetic model for the regulation of electron transfer through cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1142**: 165-174
- Siedow JN, Umbach AL, Moore AL** (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett* **362**: 10-14
- Siedow JN, Umbach AL** (1995) Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell* **7**: 821-831
- Siedow JN, Umbach AL** (2000) The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 432-439
- Simkin AJ, Breitenbach J, Kuntz M, Sandmann G** (2000) In vitro and in situ inhibition of carotenoid biosynthesis in *Capsicum annuum* by bleaching herbicides. *J Agric Food Chem* **48**: 4676-4680
- Simkin AJ** (2002) Etude de l'expression des gènes de la biosynthèse des caroténoïdes et de la sur-expression hétérologue d'une protéine de structure chez la tomate. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier, Grenoble
- Simons BH, Millenaar FF, Mulder L, Van Loon LC, Lambers H** (1999) Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of Arabidopsis with *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Plant Physiol* **120**: 529-538
- Skubatz H, Nelson TA, Meeuse BJD, Bendich AJ** (1991) Heat production in the voodoo lily (*Sauromatum guttatum*) as monitored by infrared thermography. *Plant Physiol* **95**: 1084-1088
- Spreitzer RJ, Salvucci ME** (2002) RUBISCO: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **53**: 449-475
- Strand A, Hurry V, Henkes S, Huner N, Gustafsson P, Gardestrom P, Stitt M** (1999) Acclimation of Arabidopsis leaves developing at low temperatures. Increasing

cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiol* **119**: 1387-1398

Streb P, Feierabend J, Bligny R (1997) Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant cell environ.* **20**: 1030-1040

Streb P, Shang W, Feierabend J, Bligny R (1998) Divergent strategies of photoprotection in high mountain plants. *Planta* **207**: 313-324

Streb P, Shang W, Feierabend J (1999) Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress. *Plant cell environ.* **22**: 1211-1223

Streb P, Aubert S, Gout E, Bligny R (2003) Cold- and light-induced changes of metabolite and antioxidant levels in two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* and a lowland species *Pisum sativum*. *Physiol Plant* **118**: 96-104

Streb P, Aubert S, Gout E, Bligny R (2003) Reversibility of cold- and light-stress tolerance and accompanying changes of metabolite and antioxidant levels in the two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *J Exp Bot* **54**: 405-418

Tardy F, Havaux M (1997) Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1330**: 179-193

Thomson WW, Whatley JM (1980) Development of nongreen plastids. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 375-394

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680

Tolbert NE (1997) The C2 oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 1-25

Umbach AL, Siedow JN (1993) Covalent and Noncovalent Dimers of the Cyanide-Resistant Alternative Oxidase Protein in Higher Plant Mitochondria and Their Relationship to Enzyme Activity. *Plant Physiol* **103**: 845-854

Umbach AL, Wiskich JT, Siedow JN (1994) Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS Lett* **348**: 181-184

Umbach AL, Siedow JN (1996) The reaction of the soybean cotyledon mitochondrial cyanide-resistant oxidase with sulfhydryl reagents suggests that alpha-keto acid activation involves the formation of a thiohemiacetal. *J Biol Chem* **271**: 25019-25026

Umbach AL, Siedow JN (2000) The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arch Biochem Biophys* **378**: 234-245

Umbach AL, Gonzalez-Meler MA, Sweet CR, Siedow JN (2002) Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* **1554**: 118-128

Vanlerberghe GC, McIntosh L (1992) Coordinate regulation of cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco. *Plant Physiol* **100**: 1846-1851

Vanlerberghe GC, McIntosh L (1994) Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression. Studies with the alternative oxidase gene of tobacco. *Plant Physiol* **105**: 867-874

Vanlerberghe GC, Day DA, Wiskich JT, Vanlerberghe AE, McIntosh L (1995) Alternative Oxidase Activity in Tobacco Leaf Mitochondria: Dependence on Tricarboxylic Acid Cycle-Mediated Redox Regulation and Pyruvate Activation. *Plant Physiol* **109**: 353-361

Vanlerberghe GC, McIntosh L (1996) Signals Regulating the Expression of the Nuclear Gene Encoding Alternative Oxidase of Plant Mitochondria. *Plant Physiol* **111**: 589-595

Vanlerberghe GC, McIntosh L (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 704-734

Vanlerberghe GC, McIntosh L, Yip JY (1998) Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell* **10**: 1551-1560

Vanlerberghe GC, Yip JY, Parsons HL (1999) In Organello and in Vivo Evidence of the Importance of the Regulatory Sulfhydryl/Disulfide System and Pyruvate for Alternative Oxidase Activity in Tobacco. *Plant Physiol* **121**: 793-803

Vanlerberghe GC, Robson CA, Yip JY (2002) Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant Physiol* **129**: 1829-1842

von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* **12**: 625-634

Wagner AM (1995) A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett* **368**: 339-342

Werdan K, Heldt HW, Milovancev M (1975) The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO₂ fixation in the light and dark. *Biochim Biophys Acta* **396**: 276-292

Wetzel CM, Jiang CZ, Meehan LJ, Voytas DF, Rodermeil SR (1994) Nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *Plant J* **6**: 161-175

Wetzel CM, Rodermeil SR (1998) Regulation of phytoene desaturase expression is independent of leaf pigment content in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **37**: 1045-1053

Wildi B (1996) Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant cell environ.* **19**: 138-146

Wollman FA (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *Embo J* **20**: 3623-3630

Wu D, Wright DA, Wetzel C, Voytas DF, Rodermeil S (1999) The *IMMUTANS* variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell* **11**: 43-55

Yip JY, Vanlerberghe GC (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. *Physiol Plant* **112**: 327-333

PUBLICATIONS ASSOCIÉES AU TRAVAIL DE THÈSE

PUBLICATIONS ASSOCIÉES AU TRAVAIL DE THÈSE

LISTE DES PUBLICATIONS

Laurent Cournac , Eve-Marie Josse, Thierry Joët, Dominique Rumeau, Kevin Redding, Marcel Kuntz, Gilles Peltier (2000) Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 1447-1454

Laurent Cournac, Kevin Redding, Jacques Ravenel, Dominique Rumeau, Eve-Marie Josse, Marcel Kuntz, Gilles Peltier (2000) Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J Biol Chem* **275**: 17256-17262

Eve-Marie Josse, Andrew J. Simkin, Joël Gaffé, Anne-Marie Labouré, Marcel Kuntz, Pierre Carol (2000) A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol* **123**: 1427-1436

Thierry Joët, Bernard Genty, Eve-Marie Josse, Marcel Kuntz, Laurent Cournac, Gilles Peltier (2002) Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco. *J Biol Chem* **277**: 31623-31630

Eve-Marie Josse, Jean-Pierre Alcaraz, Anne-Marie Labouré, Marcel Kuntz (2003) In vitro characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX). *Eur J Biochem* **270**: 3787-3794

Elena Baena-Gonzalez, Yagut Allahverdiyeva, Zora Svab, Pal Maliga, Eve-Marie Josse, Marcel Kuntz, Pirkko Maenpaa, Eva-Mari Aro (2003) Deletion of the tobacco plastid *psbA* gene triggers an upregulation of the thylakoid-associated NAD(P)H dehydrogenase complex and the plastid terminal oxidase (PTOX). *Plant J* **35**: 704-716

Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration

Laurent Cournac, Eve-Marie Josse, Thierry Joët, Dominique Rumeau, Kevin Redding, Marcel Kuntz, and Gilles Peltier

Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration

Laurent Cournac^{1*}, Eve-Marie Josse², Thierry Joët¹, Dominique Rumeau¹, Kevin Redding³, Marcel Kuntz² and Gilles Peltier¹

¹CEA/Cadarache, DSV, DEVM, Laboratoire d'Ecophysiologie de la Photosynthèse, 13108 Saint-Paul-lez-Durance, France

²Laboratoire de Génétique Moléculaire des Plantes, CNRS-Université Joseph Fourier, UMR 5575, BP 53X, 38041 Grenoble Cedex 09, France

³Department of Chemistry and Coalition for Biomolecular Products, The University of Alabama, Tuscaloosa, AL 35487-0336, USA

Besides electron transfer reactions involved in the 'Z' scheme of photosynthesis, alternative electron transfer pathways have been characterized in chloroplasts. These include cyclic electron flow around photosystem I (PS I) or a respiratory chain called chlororespiration. Recent work has supplied new information concerning the molecular nature of the electron carriers involved in the non-photochemical reduction of the plastoquinone (PQ) pool. However, until now little is known concerning the nature of the electron carriers involved in PQ oxidation. By using mass spectrometric measurement of oxygen exchange performed in the presence of ¹⁸O-enriched O₂ and *Chlamydomonas* mutants deficient in PS I, we show that electrons can be directed to a quinol oxidase sensitive to propyl gallate but insensitive to salicyl hydroxamic acid. This oxidase has immunological and pharmacological similarities with a plastid protein involved in carotenoid biosynthesis.

Keywords: chlororespiration; quinol oxidase; chloroplast; oxygen; *Chlamydomonas*

1. INTRODUCTION

During photosynthesis, two photosystems (PS II and PS I), coupled through an electron transfer chain, transform light energy to chemical energy. Besides this main electron transport pathway, called the 'Z' scheme of photosynthesis, alternative pathways such as cyclic electron transport around PS I (Arnon 1955; Heber & Walker 1992; Ravenel *et al.* 1994) and a respiratory chain called chlororespiration (Bennoun 1982; Peltier *et al.* 1987) have been identified in thylakoid membranes. Recent work has supplied some clues on the molecular properties of electron carriers involved in alternative pathways. First, a NAD(P)H dehydrogenase complex (Ndh), encoded by plastidial *ndh* genes, has been characterized in thylakoid membranes (Guedeney *et al.* 1996; Sazanov *et al.* 1998). Inactivation of *ndh* genes by plastid transformation was simultaneously performed by different laboratories (Burrows *et al.* 1998; Shikanai *et al.* 1998; Kofer *et al.* 1998; Cournac *et al.* 1998). It was shown that the Ndh complex is involved in the non-photochemical reduction of plastoquinones (PQ) occurring in the dark after a period of illumination and it was further suggested that this complex is involved in cyclic electron flow around PS I and in chlororespiration. Although not characterized at a

molecular level, the existence of other activities, such as ferredoxin quinone reductase activity (Bendall & Manasse 1995; Endo *et al.* 1998) or non-electrogenic NAD(P)H dehydrogenase activity—different from the Ndh complex and involved in PQ reduction (Corneille *et al.* 1998)—have been reported in thylakoids.

If the nature of electron carriers involved in non-photochemical reduction of the PQ pool appears better understood, the nature of electron carriers involved in plastoquinol oxidation remains a subject of controversy. Recently, a homologue to mitochondrial alternative oxidase has been simultaneously characterized in *Arabidopsis* thylakoid membranes by two different laboratories (Carol *et al.* 1999; Wu *et al.* 1999). This enzyme, which is encoded by the nuclear gene *immutans*, has been shown to be essential during carotenoid biosynthesis and it was assumed that it might catalyse plastoquinol oxidation and be involved in chlororespiration. In contrast, based on experiments performed *in vitro*, Casano *et al.* (2000) recently proposed a chlororespiration model in which plastoquinol oxidation would be achieved by a plastidial peroxidase, H₂O₂ being used as an electron acceptor.

In order to elucidate the nature of the chlororespiratory oxidase, we have used photosynthetic mutants of the green alga *Chlamydomonas* and performed mass spectrometric measurements. Mass spectrometry, using ¹⁸O-labelled O₂,

* Author for correspondence (laurent.cournac@cea.fr).

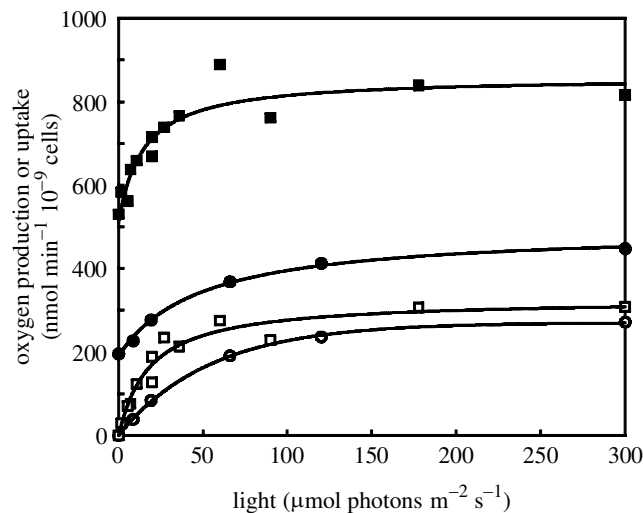


Figure 1. Photosynthetic oxygen evolution measured in intact *Chlamydomonas* cells. Measurements were performed in two independent PS-I-deficient strains showing different chlorophyll contents. Circles, mutant strain *psaAΔ1*, 0.44 mg chlorophyll 10^{-9} cells. Squares, mutant strain *psaBAΔ7*, 2.3 mg chlorophyll 10^{-9} cells. Rates of PS II oxygen production (deduced from $^{16}\text{O}_2$ enrichment of the medium) and of oxygen uptake (deduced from $^{18}\text{O}_2$ depletion of the medium) are plotted versus the illumination intensity. Open circles, *psaAΔ1* production; closed circles, *psaAΔ1* uptake; open squares, *psaBAΔ7* production; closed squares, *psaBAΔ7* uptake.

is a powerful way to determine whether electrons produced at PS II (measured as unlabelled O_2 from water photolysis) are diverted towards O_2 or to another electron acceptor. By performing such measurements in *Chlamydomonas* preparations lacking either the PS I complex or the cytochrome (cyt) b_6f complex, we show that electrons provided by PS II can be diverted at a significant rate towards a chloroplast quinol oxidase. Based on the similarity of immunological (Cournac *et al.* 2000) and pharmacological properties between the *immutans* encoded plastid terminal oxidase (PTOX) in *Arabidopsis* and the plastoquinol oxidizing activity in *Chlamydomonas*, we propose the involvement of a quinol oxidase in chlororespiration.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chlamydomonas reinhardtii cells were grown on a tris-acetate-phosphate medium (TAP). Algal cultures were maintained at 25 °C under continuous agitation and low illumination (about $1 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The wild-type strain used in this work was isolated as a *mt*⁺ segregant of a cross between two strains isogenic to the 137c strain (Harris 1989). The original deletions of *psaA* and *psaB* (chloroplast genes which encode essential subunits of PS I) were made in this strain as previously reported (Fischer *et al.* 1996). Marker recycling allowed subsequent transformations to delete the chloroplast *petA* gene, which encodes for an essential subunit of cyt b_6f (Cournac *et al.* 2000).

Prior to thylakoid isolation, the cells were harvested, centrifuged (600 *g*, 5 min) and washed once with 15 mM HEPES-KOH, pH 7.2. After centrifugation in the washing medium (600 *g*, 5 min), the pellet (around 5×10^8 cells) was resuspended in 10 ml buffer A (0.3 M sorbitol, 50 mM HEPES-KOH, pH 7.8,

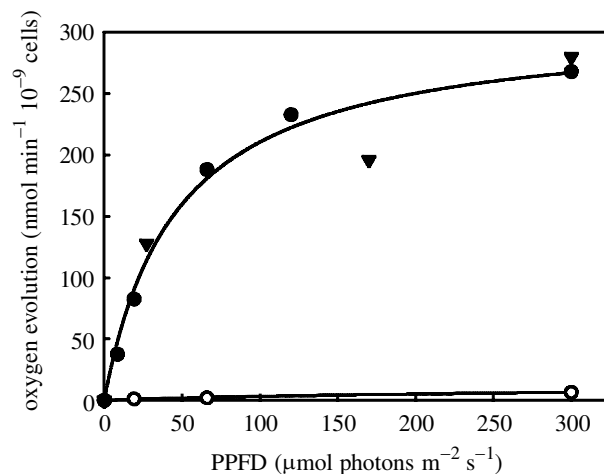


Figure 2. Effect of DCMU and loss of the cyt b_6f complex on the PS-II-driven O_2 production measured in intact *Chlamydomonas* cells using $^{18}\text{O}_2$ to label dissolved oxygen and monitoring $^{16}\text{O}_2$ (produced by PS II) and $^{18}\text{O}_2$ (taken up) with mass spectrometry. Closed circles, mutant strain *psaAΔ1* deficient in PS I; open circle, mutant strain *psaAΔ1* in the presence of 10 μM DCMU; closed triangles, double mutant *psaAΔ1 petAΔ1* deficient in PS I and in the cyt b_6f complex.

2 mM EDTA, 5 mM MgCl_2) supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA). Thylakoids were obtained through disruption in a French press chamber of the cells at 5000 psi in buffer A + 1% BSA (two runs). After disruption, broken or intact cells and heavy parts were discarded by centrifugation (600 *g*, 3 min). The supernatant was then centrifuged at 3000 *g*. The pellet (thylakoid fraction) was resuspended in 300–500 μl buffer A (without BSA) and stored on ice until used in the experiments. Oxygen exchange assays were conducted in buffer A without BSA.

Thylakoid membranes were resuspended in buffer A up to 1.5 ml in the measuring chamber. For measuring O_2 exchange on whole cells, algal cultures were harvested in exponential growth phase, centrifuged, washed and resuspended in buffer A. One and a half millilitres of the suspension was placed in the measuring chamber: a Clarke electrode-type thermostated and stirred cylindrical vessel (Hansatech, Norfolk, UK) fitted onto a mass spectrometer connecting device. Dissolved gases were directly introduced in the ion source of the mass spectrometer (model MM 14-80, VG instruments, Cheshire, UK) through a Teflon membrane as described in Cournac *et al.* (1993). For O_2 exchange measurements, the sample was sparged with N_2 to remove $^{16}\text{O}_2$, and $^{18}\text{O}_2$ (95% ^{18}O isotope content, Euriso-Top, Les Ulis, France) was then introduced to achieve an O_2 concentration in solution close to that in equilibrium with normal air. Light was supplied by a fibre-optic illuminator (Schott, Mainz, Germany) and neutral filters were used to vary light intensity. Unless specified, experiments shown here were performed at $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ incident light. All gas exchange measurements were performed at 25 °C. The chloroplastic extracts were used as quickly as possible after extraction.

The portion of the *Arabidopsis immutans* cDNA coding for the entire mature peptide (PTOX) was PCR-amplified and inserted in the *Escherichia coli* expression vector pQE31 (Qiagen, Courtaboeuf, France) as described elsewhere (Cournac *et al.* 2000; Josse *et al.* 2000). The recombinant membrane protein PTOX which possesses a 6 His-tag was

Table 1. *Effect of electron acceptors on oxygen exchange*

(Measured in intact cells or thylakoids of the *psaAA* and *psaAA petAA* strains. *E*, photosynthetic O₂ evolution; δU , light-induced oxygen uptake (uptake in the light – uptake in the dark).)

treatment	<i>psaAA</i>				<i>psaAA petAA</i>			
	nmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ chlorophyll		nmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ chlorophyll		nmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ chlorophyll		nmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ chlorophyll	
	intact cells	thylakoids	intact cells	thylakoids	intact cells	thylakoids	intact cells	thylakoids
	<i>E</i>	δU	<i>E</i>	δU	<i>E</i>	δU	<i>E</i>	δU
control	520	560	120	130	570	510	140	170
FeCN	620	640	670	80	550	590	170	160
DCBQ	980	10	900	0	1100	30	930	10

produced in *E. coli*. After induction, cells were lysed and membranes were recovered upon centrifugation at 100 000 *g* for 1 h. Pelleted membranes were resuspended in tris-HCl 0.2 M, pH 7.5, sucrose 0.75 M. Oxygen consumption was measured in a Clark O₂ electrode chamber (Hansatech). A typical assay contained 100 g membrane protein in the following buffer: tris-maleate 50 mM, pH 7.5, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, decyl-plastoquinone 0.2 mM.

3. RESULTS

PS-I-deficient algae obtained by inactivation of *psaA* or *psaB* genes were illuminated in the presence of ¹⁸O-labelled O₂, and O₂ exchange was determined by mass spectrometry by following concentration changes in ¹⁸O₂ and ¹⁶O₂. As previously reported in nuclear mutants deficient in PS I (Peltier & Thibault 1988) or in plastid mutants (Cournac *et al.* 1997), significant O₂ evolution by PS II was measured, this phenomenon being accompanied by a simultaneous stimulation of O₂ uptake (figure 1). In these conditions, no change in the apparent respiration rate was observed, since light-dependent O₂ production and light-stimulated O₂ uptake are of the same amplitude. Light-dependent oxygen evolution was measured in different PS-I-deficient mutants. The maximal (light-saturated) activity was variable when expressed on a chlorophyll basis (from 120–600 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ chlorophyll), but was more constant when normalized to the cell number (250–350 nmol O₂ min⁻¹ 10⁻⁹ cells) or to the protein amounts (8–13 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ protein), probably reflecting differences in chlorophyll contents between strains. Figure 1 shows O₂ exchange data in two strains with different chlorophyll contents. Comparable rates of maximal electron transfer activity were reached by both strains, but strains with higher chlorophyll contents were found to be more efficient at low light intensities. Note that the maximum rate of O₂ evolution in PS-I-deficient mutants represented about 10% of the maximal O₂ production rate measured in wild-type cells (not shown). The PS-II-dependent O₂ production was previously reported to be strongly affected by inhibition of mitochondrial respiration (Peltier & Thibault 1988; Cournac *et al.* 2000). However, we found that the light-driven activity of PS II was unaffected by the increase in respiration consecutive to acetate addition (data not shown) or by the level of basal respiration

observed in different mutant strains (see figure 1). In contrast, the PS-II-dependent activity was found to vary during the algal cell cycle. Maximal activity was present during exponential growth, but severely decreased during the stationary phase (data not shown).

DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), an inhibitor blocking photosynthetic electron transfer between Q_A (the primary quinone acceptor of PS II) and Q_B (the secondary quinone acceptor, which exchanges with the PQ pool), strongly inhibited the PS-II-driven O₂ evolution (figure 2). Also, the PS-II-dependent electron flow was observed in the absence of the *cyt b₆f* complex in a *Chlamydomonas* double mutant *psaAA petAA* lacking both PS I and *cyt b₆f* (figure 2). Similar results were obtained in the single mutant (*petAA*) deficient in *cyt b₆f* or in the presence of 1 μM dibromothymoquinone (DBMIB), a *cyt b₆f* inhibitor (not shown). We conclude from these data that the PQ pool, but not the *cyt b₆f* complex, is involved in the PS-II-dependent pathway.

In order to determine the maximal PS II activity present in thylakoids of PS-I-deficient mutants, we measured photosynthetic O₂ evolution in the presence of artificial electron acceptors like 1,5-dichlorobenzoquinone (DCBQ) or potassium ferricyanide (FeCN) (table 1). In the presence of DCBQ, PS II activity was increased, indicating that PS II was not limiting the electron transport activity. In parallel, the light stimulation of O₂ uptake was completely suppressed. A similar effect was observed in whole cells and in a double mutant lacking PS I and the *cyt b₆f* complex (table 1). An increase in O₂ evolution was also observed in thylakoids of PS-I-deficient mutants when using FeCN as an electron acceptor. This effect was accompanied by a *ca.* 40% diminution of the light-induced stimulation of O₂ uptake (table 1). However, FeCN had no significant effect on the PS-II-dependent O₂ evolution in intact cells, which is explained by the fact that this compound cannot enter intact cells. Interestingly, FeCN has no significant effect on O₂ exchange rates measured in thylakoids from the *Chlamydomonas* strain lacking both PS I and the *cyt b₆f* complex (*psaAA petAA*, table 1).

A gene (*immutans*) encoding a plastid protein (PTOX) showing a high homology with the mitochondrial alternative oxidase, was recently discovered in *Arabidopsis thaliana* (Carol *et al.* 1999; Wu *et al.* 1999). As it was not easy to assay oxidase activity in *Arabidopsis* chloroplasts,

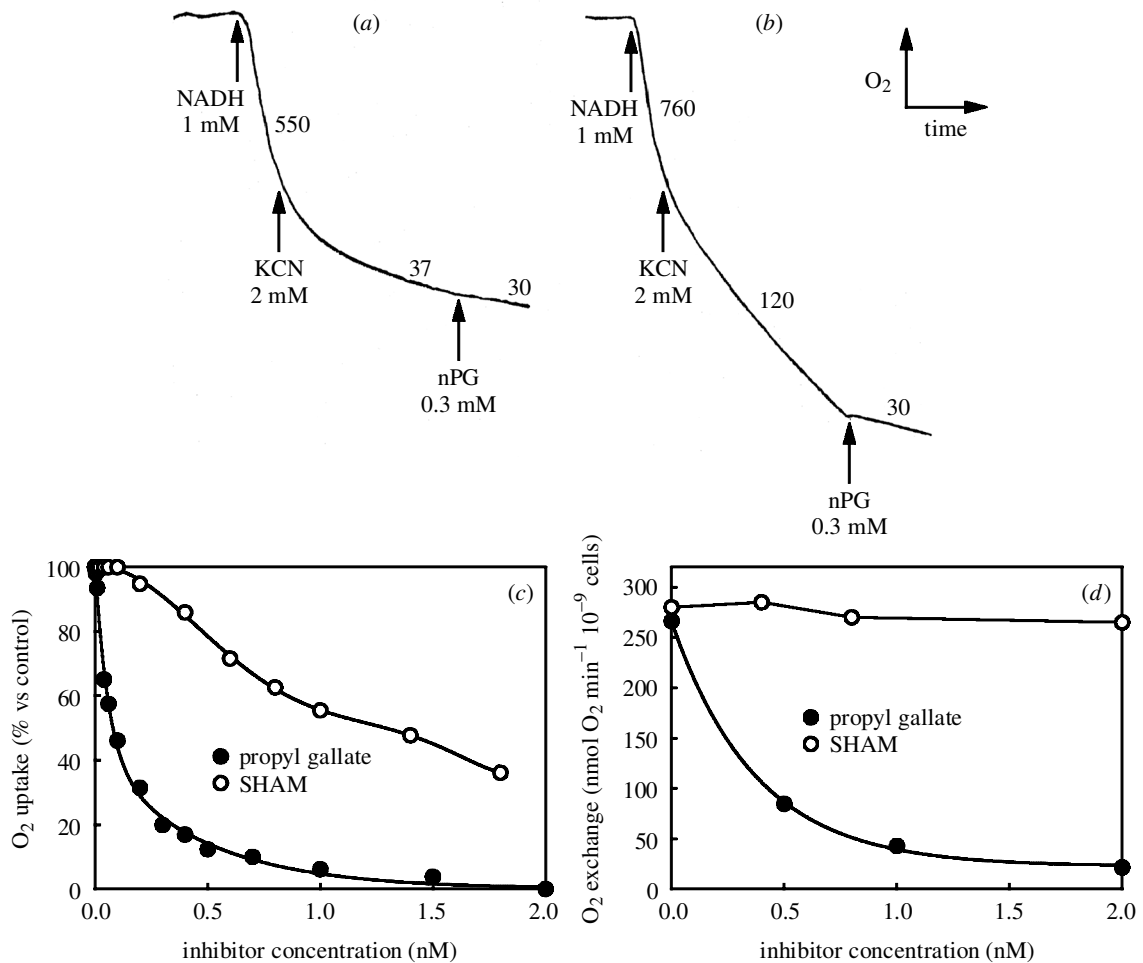


Figure 3. (a,b) Effects of sequential addition of KCN and propyl gallate on O₂ uptake induced by addition of NADH in membranes of *E. coli* from (a) control cells and (b) cells expressing the PTOX protein. O₂ uptake are given in nmol min⁻¹ mg protein⁻¹. (c) Sensitivity of the PTOX-induced O₂ uptake to propyl gallate and SHAM in membranes of *E. coli*. (d) Sensitivity of PS-II-driven O₂ exchange to propyl gallate and SHAM in *Chlamydomonas* mutants deficient in PS I.

due to the low abundance of PTOX in chloroplasts and to the possible occurrence of mitochondrial cross-contamination, PTOX was produced as a recombinant protein in *E. coli*. After induction of the chimeric gene, the oxidase activity of membrane preparations was assayed by adding NADH and measuring oxygen consumption. KCN (1 mM) was used to inhibit oxygen consumption due to the cytochrome oxidase pathway (Josse *et al.* 2000). Expression of PTOX in *E. coli* membranes conferred a significantly higher cyanide-resistant oxygen consumption (figure 3a,b). Propyl gallate and salicylhydroxamic acid (SHAM) are well-known inhibitors of the mitochondrial alternative oxidase. The PTOX-dependent and cyanide-resistant oxidase activity was sensitive to propyl gallate (figure 3a-c), but at least ten times less sensitive to SHAM (figure 3c). The PS-II-dependent activity of PS-I-inactivated mutants showed comparable sensitivity to propyl gallate and was insensitive to SHAM up to 2 mM (figure 3d).

4. DISCUSSION

(a) Characteristics of photosynthetic electron transport in PS-I-deficient mutants

In agreement with previous findings (Peltier & Thibault 1988; Cournac *et al.* 1997; Redding *et al.* 1999),

results shown in this paper show that significant electron transport activity occurs from PS II to O₂ in PS-I-deficient *Chlamydomonas* mutants. Based on the effect of DCMU and on measurements performed in strains lacking the cyt *b₆f* complex, we conclude that the electron flow between PS II and molecular O₂ involves the thylakoid PQ pool, but not the cyt *b₆f* complex. Due to its electronic requirements and to its insensitivity to relative oxygen species (ROS) scavengers, PQ oxidation has been concluded to involve an enzymatic process reducing molecular O₂ into water (Cournac *et al.* 2000). As demonstrated here using an artificial electron acceptor for PS II (DCBQ), the activity of oxidase limits PS-II-dependent O₂ evolution in the absence of PS I. This explains why the maximal rates of O₂ evolution in PS-I-deficient cells are five to 20 times lower than that in wild-type cells, where PS I and cyt *b₆f* cooperate to reoxidize the PQ pool. However, light saturation curves of PS II activity indicate that PS-II-driven electron transport is limited by chlorophyll content at low light, and by oxidase content at high light. This suggests that oxygen uptake is not directly dependent on chlorophyll and is not related to chlorophyll photo-oxidation, further supporting the involvement of an enzymatic process in plastoquinol oxidation.

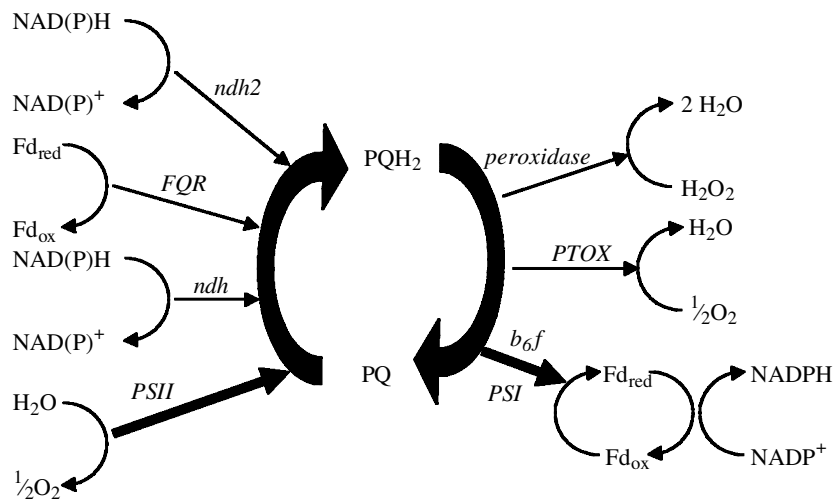


Figure 4. Schematic representations of the different plastoquinone (PQ) reduction and plastoquinol (PQH₂) oxidation pathways now evidenced in thylakoid membranes. Fd_{red}, reduced ferredoxin; Fd_{ox}, oxidized ferredoxin; ndh, complex I-like NAD(P)H dehydrogenase; ndh2, alternative NADH dehydrogenase; FQR, ferredoxin–quinone reductase; PTOX, plastid terminal oxidase (the quinol oxidase described in this paper).

Interestingly, we found that FeCN could accept electrons from PS II in PS-I-deficient strains containing *cyt b₆f*, but not in *cyt b₆f*-depleted strains. This shows that FeCN can interact with the intersystem photosynthetic electron transport chain, probably at the level of *cyt f* as previously reported (Wood & Bendall 1976). This also indicates that the *cyt b₆f* complex of PS-I-deficient mutants keeps the ability to oxidize plastoquinol and to compete efficiently with the quinol oxidase.

The influence of various inhibitors has given us clues as to the nature of the chloroplast oxidase involved in this plastoquinol oxidation. Cyanide, which has been reported to impair chlororespiration (Buchel & Garab 1995; Bennoun 1982; Peltier *et al.* 1987) or cyanobacterial quinol oxidases (Howitt & Vermaas 1998; Buchel *et al.* 1998), had no effect unless very high concentrations were used (Cournac *et al.* 2000). The absence of effect of FeCN on plastoquinol oxidation in the *cyt b₆f*-deleted strain (table 1) also precludes the involvement of a soluble transporter such as soluble cytochromes, since FeCN can interact with such cytochromes, as shown in mitochondria (Hoefnagel *et al.* 1995).

(b) Similarities between the *Chlamydomonas* plastoquinol oxidase and PTOX

In plant mitochondria, quinol oxidation can be accomplished either by the *cyt bc₁* complex (cyanide-sensitive pathway), or directly to molecular O₂ through an alternative oxidase (cyanide-insensitive pathway). Alternative oxidases have been reported to be inhibited by compounds such as SHAM or propyl gallate (Siedow 1980). We found that propyl gallate, but not SHAM, inhibited the PS II-to-O₂ electron flow in *C. reinhardtii* mutants deficient in PS I. Interestingly, Berthold (1998) reported the existence of different mutant forms of the *Arabidopsis thaliana* mitochondrial alternative oxidase that are resistant to SHAM but remain sensitive to propyl gallate, thus showing that sensitivity to these two inhibitors is separable.

Recently, two laboratories simultaneously reported the existence, in *Arabidopsis thaliana*, of a gene (*immutans*) coding for a plastid protein (PTOX) showing homology with mitochondrial alternative oxidases (Carol *et al.* 1999; Wu *et al.* 1999). Based on the phenotype of mutants

affected in the *immutans* gene, it was concluded that PTOX is involved in carotenoid biosynthesis, more particularly in phytoene desaturation. The authors proposed a model in which PTOX would catalyse reoxidation of plastoquinol to PQ, using O₂ as a terminal acceptor. We have shown that PTOX, when expressed in *E. coli*, confers a KCN-insensitive quinol oxidase activity. In this assay, the plastid oxidase PTOX is sensitive to propyl gallate and much less sensitive to SHAM. Interestingly, PTOX appears to be more resistant to both inhibitors than mitochondrial alternative oxidase (Berthold 1998). Figure 3 indicates that both PTOX and the *Chlamydomonas* plastoquinol oxidase have similar sensitivities towards propyl gallate. Both activities show resistance towards SHAM, but PTOX appears significantly more sensitive. Differences in SHAM sensitivity can be explained by different hypotheses.

- The oxidases are not exactly the same, and the *Chlamydomonas* type is more resistant to SHAM.
- The O₂ uptake in *E. coli* membranes is more sensitive to SHAM than in thylakoids, some modifications of its properties being induced by the expression system (a chimeric gene in a bacterial context).

Based on similar effects of inhibitors on PTOX and PS-II-driven electron flow, we conclude that the enzyme responsible for plastoquinol oxidation in *Chlamydomonas* is closely related to PTOX. This conclusion is further supported by immunological data (Cournac *et al.* 2000).

(c) Oxygen, reactive oxygen species and chlororespiration

We have concluded from our experiments that the major part of chloroplast O₂ uptake is due to the activity of a quinol oxidase that uses molecular O₂ as an electron acceptor and is sensitive to propyl gallate but insensitive to cyanide. Such a sensitivity to inhibitors appears contradictory to the involvement in chlororespiration of a cyanide-sensitive oxidase, as concluded by different authors (Bennoun 1982; Peltier *et al.* 1987; Buchel & Garab 1995). On the other hand, the use of molecular O₂ as a terminal acceptor is not consistent with the model of chlororespiration recently proposed by Casano *et al.* (2000). Indeed, based on experiments performed on an

in vitro reconstructed system, these authors proposed that plastoquinol oxidation was achieved by a plastid peroxidase using H₂O₂ as a terminal acceptor.

We cannot exclude at this stage the existence of different pathways of non-photochemical oxidation of plastoquinols, one involving a quinol oxidase and the other a peroxidase. According to Casano *et al.* (2000), the participation of a peroxidase might explain the cyanide sensitivity through an inhibition of superoxide dismutase. These different pathways might be differentially regulated depending on the environmental conditions. One might expect that the peroxidase pathway, provided that its existence is confirmed *in vivo*, would be associated with conditions generating ROS such as stress or senescence. On the other hand, PTOX would be involved in reactions occurring during the early biogenesis of chloroplasts (see Carol *et al.* 1999). This would be consistent with the higher plastoquinol oxidation activity observed during active phases of division. In this respect, it would be interesting to determine whether the peroxidase pathway is triggered during phases of senescence or in stress conditions.

It seems now likely that just as the non-photochemical PQ reduction pathways are diverse, so too are the chloroplastic O₂ (or ROS) uptake pathways (figure 4). Unravelling the molecular basis of these activities and their physiological significance will be an exciting task for the future.

The authors thank P. Carrier, Dr B. Dimon and J. Massimino (Commissariat à l'Énergie Atomique) for skilful technical assistance throughout the experiments.

REFERENCES

- Arnon, D. I. 1955 Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. *Nature* **184**, 10–21.
- Bendall, D. S. & Manasse, R. S. 1995 Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1229**, 23–38.
- Bennoun, P. 1982 Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 4352–4356.
- Berthold, D. A. 1998 Isolation of mutants of the *Arabidopsis thaliana* alternative oxidase (ubiquinol: oxygen oxidoreductase) resistant to salicylhydroxamic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 73–83.
- Buchel, 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**, 69–75.
- Buchel, C., Zsiros, O. & Garab, G. 1998 Alternative cyanide-sensitive oxidase interacting with photosynthesis in *Synechocystis* PCC6803. Ancestor of the terminal oxidase of chlororespiration? *Photosynthetica* **35**, 223–231.
- Burrows, P. A., Sazanov, L. A., Svab, Z., Maliga, P. & Nixon, P. J. 1998 Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J.* **17**, 868–876.
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G. & Kuntz, M. 1999 Mutations in the *Arabidopsis* gene *immutans* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* **11**, 57–68.
- Casano, L. M., Zapata, J. M., Martin, M. & Sabater, B. 2000 Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport—plastoquinone as electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 942–948.
- Corneille, S., Cournac, L., Guedeney, G., Havaux, M. & Peltier, G. 1998 Reduction of the plastoquinone pool by exogenous NADH and NADPH in higher plant chloroplasts—characterization of a NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 59–69.
- Cournac, L., Dimon, B. & Peltier, G. 1993 Evidence for ¹⁸O labeling of photorespiratory CO₂ in photoautotrophic cell cultures of higher plants illuminated in the presence of ¹⁸O₂. *Planta* **190**, 407–414.
- Cournac, L., Redding, K., Bennoun, P. & Peltier, G. 1997 Limited photosynthetic electron flow but no CO₂ fixation in *Chlamydomonas* mutants lacking photosystem I. *FEBS Lett.* **416**, 65–68.
- Cournac, L., Guedeney, G., Joet, T., Rumeau, D., Latouche, G., Cerovic, Z., Redding, K., Horvath, E., Medgyesy, P. & Peltier, G. 1998 Non-photochemical reduction of intersystem electron carriers in chloroplasts of higher plants and algae. In *Photosynthesis: mechanism and effects* (ed. G. Garab), pp. 1877–1882. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.
- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E.-M., Kuntz, M. & Peltier, G. 2000 Electron flow between PS II and oxygen in chloroplasts of PS I deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J. Biol. Chem.* (In the press.)
- Endo, T., Shikanai, T., Sato, F. & Asada, K. 1998 NAD(P)H dehydrogenase-dependent, antimycin A-sensitive electron donation to plastoquinone in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1226–1231.
- Fischer, N., Stampacchia, O., Redding, K. & Rochaix, J.-D. 1996 Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 373–380.
- Guedeney, G., Corneille, S., Cuine, S. & Peltier, G. 1996 Evidence for an association of *ndh B*, *ndh J* gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Lett.* **378**, 277–280.
- Harris, E. H. 1989 *The Chlamydomonas sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use*. San Diego, CA: Academic Press.
- Heber, U. & Walker, D. A. 1992 Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol.* **100**, 1621–1626.
- Hoefnagel, M. H., Millar, A. H., Wiskich, J. T. & Day, D. A. 1995 Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 394–400.
- Howitt, C. A. & Vermaas, W. F. J. 1998 Quinol and cytochrome oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **37**, 17 944–17 951.
- Josse, E.-M., Simkin, A. J., Gaffé, J., Labouré, A.-M., Kuntz, M. & Carol, P. 2000 A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol.* (Submitted.)
- Kofer, W., Koop, H. U., Wanner, G. & Steinmüller, K. 1998 Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plasmome transformation. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 166–173.
- Peltier, G. & Thibault, P. 1988 Oxygen-exchange studies in *Chlamydomonas* mutants deficient in photosynthetic electron transport: evidence for a photosystem II-dependent oxygen uptake *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **936**, 319–324.
- Peltier, G., Ravenel, J. & Verméglie, A. 1987 Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas*: evidence for a chlororespiration. *Biochim. Biophys. Acta* **893**, 83–90.

- Ravenel, J., Peltier, G. & Havaux, M. 1994 The cyclic electron pathways around photosystem-I in *Chlamydomonas reinhardtii* as determined *in vivo* by photoacoustic measurements of energy storage. *Planta* **193**, 251–259.
- Redding, K., Cournac, L., Vassiliev, I. R., Golbeck, J. H., Peltier, G. & Rochaix, J. D. 1999 Photosystem I is indispensable for photoautotrophic growth, CO₂ fixation, and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **274**, 10 466–10 473.
- 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. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 1319–1324.
- Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K. & Yokota, A. 1998 Directed disruption of the tobacco *ndh B* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 9705–9709.
- Siedow, J. N. 1980 Alternative respiratory pathway: its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. *Plant Physiol.* **65**, 669–674.
- Wood, P. M. & Bendall, D. S. 1976 The reduction of plastocyanin by plastoquinol-1 in the presence of chloroplasts. A dark electron transfer reaction involving components between the two photosystems. *Eur. J. Biochem.* **61**, 337–344.
- Wu, D. Y., Wright, D. A., Wetzell, 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. *Plant Cell* **11**, 43–55.

Discussion

J. Barber (*Department of Biochemistry, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London, UK*). Have you estimated the stoichiometric level of the PQ oxidase and the NAD complex in normal chloroplasts relative to the major complexes such as PS I, PS II and cyt *b₆f*?

G. Peltier. Sazanov *et al.* (1996) have estimated that the Ndh complex of pea chloroplasts represented less than 0.2% of total thylakoid membrane proteins (about one complex every 100 photosynthetic chains). It is therefore clearly a minor component of thylakoid membranes compared with the major complexes such as PS I, PS II or cyt *b₆f*. We have not yet estimated the amounts of the chlororespiratory oxidase present in thylakoid membranes. However, one may speculate that, like the Ndh complex, it represents a minor component of thylakoid membranes. This probably explains why these enzymes have not been discovered earlier.

K. Niyogi (*Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, USA*). Have you found any evidence for reverse electron flow through the Ndh complex?

G. Peltier. No, we have no evidence for this occurrence of reverse electron flow through the Ndh complex. Initially, the inhibition of the PS-II-dependent O₂ evolution by respiratory inhibitors observed in intact *Chlamydomonas* cells from PS-I-deficient mutants was interpreted by the generation of NAD(P)H through an energy-dependent reverse electron transfer occurring through a putative chloroplast Ndh complex and a transfer of reducing equivalents from the chloroplast to the mitochondria (Peltier & Thibault 1988). However, as shown here, and as recently published by Cournac *et al.* (2000), PS-II-dependent O₂ evolution could be measured in chloroplasts

from PS-I-deficient mutants and was insensitive to respiratory inhibitors. We have concluded from these data that the PS-II-dependent O₂ evolution observed in PS-I-deficient mutants is due to a diversion of electrons towards a chloroplast oxidase. The inhibition of the PS-II-dependent electron flow by respiratory inhibitors would be explained by a competition between PS II and stromal donors for the reduction of the PQ pool. Moreover, it now seems clear that the plastid genome of most unicellular algae lacks *ndh* genes. In *Chlamydomonas*, non-photochemical reduction of the PQ pool is probably achieved by a non-electrogenic enzyme (for a review, see Cournac *et al.* 2000). This argues against the existence of a reverse electron flow, which would be only possible with an electrogenic complex. In higher plants, such a possibility cannot be excluded, since the Ndh complex is probably electrogenic, but no evidence for such a mechanism has been obtained until now.

C. H. Foyer (*Department of Biochemistry and Physiology, IACR-Rothamsted, UK*). The role of the alternative oxidase in the mitochondrial electron transport chains is considered to be prevention of over-reduction of the PQ pool and hence uncontrolled electron drainage to oxygen. Would you consider that a possible role of the chloroplast oxidase is to prevent over-reduction of the PQ pool and hence photoinhibition?

G. Peltier. Such a role should be considered. It is clear from our experiments that in PS-I-deficient *Chlamydomonas* mutants electrons can be diverted towards the chloroplast oxidase. Whether this reaction occurs *in vivo* in the presence of active PS I remains to be answered. One may speculate that in conditions where PS I is partially inhibited, for instance during introduction of photosynthesis, where electron acceptors are lacking, or during low temperature photoinhibition, diversion towards the oxidase may prevent over-reduction of the PQ pool.

A. Laik (*Department of Plant Physiology, Tartu University, Estonia*). Is chloroplast Ndh a proton translocating enzyme? The background of my question is that with G. Edwards we measured quantum yields of C₄ plants and found them to be 15% higher than possible considering the known efficiency of cyclic electron transport. The discrepancy could be resolved with the assumption that proton-translocating Ndh participates in the cyclic electron flow in C₄-plant bundle-sheath chloroplasts.

G. Peltier. Based on the homology between plastid Ndh genes and bacterial genes encoding subunits of the NADH dehydrogenase complex, it seems likely that the chloroplast Ndh complex involved in chlororespiration and cyclic electron flow around PS I is a proton-translocating enzyme. In C₄ plants, Kubicki *et al.* (1996) have reported strong expression of Ndh genes in bundle-sheath chloroplasts. Possibly, the participation of such a proton-translocating complex to cyclic electron flow around PS I may explain increases in quantum yields.

H. C. P. Matthijs (*Department of Microbiology, University of Amsterdam, The Netherlands*). Professor Badger asked about the role of Ndh I in PS I cyclic, and pointed to the fact that Ndh I, in addition to a role in PS I cyclic,

may be directly linked to CO₂ uptake. To this I added that in a Ndh-I-less mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* which cannot grow in low CO₂ condition, growth on low CO₂ can be restored after (NaCl) stress. In this stress, PS I cyclic activity increases two- to three-fold, flavodoxin and FNR induction up to 20–30 times. This shows an intimate relationship between PS I cyclic and CO₂ uptake (Jeanjean *et al.* 1998).

G. Peltier. Our recent studies on Ndh-inactivated mutants (Horvath *et al.* 2000), have shown a role of the Ndh complex during photosynthesis under low CO₂ concentration, for instance during a stomatal closure induced by water limitation. Our interpretation is that under such conditions the requirement of photosynthetic CO₂ fixation for ATP is higher. To fix one CO₂, an ATP–NADPH ratio of 1.5 is needed under non-photorespiratory conditions, but under photorespiratory conditions this ratio increases up to 1.65. We proposed that cyclic electron flow around PS I mediated by the Ndh complex is a putative CO₂ concentrating mechanism similar to that occurring in cyanobacteria or algae. In this respect, the existence in the chloroplast genome of an open reading frame encoding a protein sharing homologies with a cyanobacterial and *Chlamydomonas* protein involved in CO₂ concentrating mechanisms is rather intriguing. However, until now, such a mechanism has not been evidenced in higher plant chloroplasts.

Additional References

- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E.-M., Kuntz, M. & Peltier, G. 2000 Electron flow between PS II and oxygen in chloroplasts of PS I deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J. Biol. Chem.* (In the press.)
- Horvath, E. M., Peter, S. O., Joët, T., Rumeau, D., Cournac, L., Horvath, G. V., Kavanagh, T. A., Schäfer, C., Peltier, G. & Medgyesy, P. 2000. Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol.* **123**, 1337–1350.
- Jeanjean, R., Bedu, S., Havaux, M., Matthijs, H. C. P. & Joset, F. 1998 Salt-induced photosystem I cyclic electron transfer restores growth on low inorganic carbon in a type I NAD(P)H dehydrogenase deficient mutant of *Synechocystis* PCC6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**, 131–137.
- Kubicki, A., Funk, E., Westhoff, P. & Steinmüller, K. 1996 Differential expression of plastome-encoded *ndh* genes in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the C₄ plant *Sorghum bicolor* indicates that the complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase is involved in cyclic electron transport. *Planta* **199**, 276–281.
- Peltier, G. & Thibault, P. 1988 Oxygen-exchange studies in *Chlamydomonas* mutants deficient in photosynthetic electron transport: evidence for a photosystem II-dependent oxygen uptake *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **936**, 319–324.
- Sazanov, L. A., Burrows, P. & Nixon, P. J. 1996 Detection and characterization of a complex I-like NADH-specific dehydrogenase from pea thylakoids. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 739–743.

Electron Flow between Photosystem II and Oxygen in Chloroplasts of Photosystem I-deficient Algae Is Mediated by a Quinol Oxidase Involved in Chlororespiration

Laurent Cournac, Kevin Redding, Jacques Ravenel, Dominique Rumeau,
Eve-Marie Josse, Marcel Kuntz, and Gilles Peltier

Electron Flow between Photosystem II and Oxygen in Chloroplasts of Photosystem I-deficient Algae Is Mediated by a Quinol Oxidase Involved in Chlororespiration*

Received for publication, October 28, 1999, and in revised form, March 20, 2000
Published, JBC Papers in Press, March 22, 2000, DOI 10.1074/jbc.M908732199

Laurent Cournac^{‡§}, Kevin Redding[¶], Jacques Ravenel[‡], Dominique Rumeau^{‡||}, Eve-Marie Josse^{**}, Marcel Kuntz^{**}, and Gilles Peltier[‡]

From the [‡]Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) Cadarache, Direction des Sciences du Vivant (DSV), Département d'Ecophysiologie Végétale et de Microbiologie (DEVN), Laboratoire d'Ecophysiologie de la Photosynthèse, 13108 Saint-Paul-lez-Durance, France, the [¶]Department of Chemistry and Coalition for BioMolecular Products, The University of Alabama, Tuscaloosa, Alabama 35487-0336, ^{||}(CEA) Cadarache, DSV, DEVN, Unité Mixte de Recherche (UMR) 163 CNRS-CEA, 13108 Saint-Paul-lez-Durance, France, and the ^{**}Laboratoire de Génétique Moléculaire des Plantes, CNRS-Université Joseph Fourier, UMR 5575, BP 53X, 38041 Grenoble Cedex 09, France

In *Chlamydomonas reinhardtii* mutants deficient in photosystem I because of inactivation of the chloroplast genes *psaA* or *psaB*, oxygen evolution from photosystem II occurs at significant rates and is coupled to a stimulation of oxygen uptake. Both activities can be simultaneously monitored by continuous mass spectrometry in the presence of ¹⁸O₂. The light-driven O₂ exchange was shown to involve the plastoquinone pool as an electron carrier, but not cytochrome *b₆f*. Photosystem II-dependent O₂ production and O₂ uptake were observed in isolated chloroplast fractions. Photosystem II-dependent oxygen exchange was insensitive to a variety of inhibitors (azide, carbon monoxide, cyanide, antimycin A, and salicylhydroxamic acid) and radical scavengers. It was, however, sensitive to propyl gallate. From inhibitors effects and electronic requirements of the O₂ uptake process, we conclude that an oxidase catalyzing oxidation of plastoquinol and reduction of oxygen to water is present in thylakoid membranes. From the sensitivity of flash-induced O₂ exchange to propyl gallate, we conclude that this oxidase is involved in chlororespiration. Clues to the identity of the protein implied in this process are given by pharmacological and immunological similarities with a protein (IMMUTANS) identified in *Arabidopsis* chloroplasts.

During oxygenic photosynthesis, electron transfer reactions involve the cooperation of two photosystems to produce O₂ at PSII¹ and reduce NADP⁺ at PSI. It is generally accepted that PSII and PSI act in series, electrons provided by PSII being used to reduce PSI electron donors through a general scheme known as the "Z scheme" of photosynthesis. According to the endosymbiotic theory, chloroplasts originate from a cyanobacterial ancestor (1) in which both oxygenic photosynthesis and aerobic respiration were likely functioning in the same cellular

compartment. In existing cyanobacteria, photosynthesis is located in thylakoid membranes, and respiration is located both in thylakoid and cytoplasmic membranes (2). It has been shown that respiratory and photosynthetic electron transport chains function in close relationship within thylakoid membranes, where they share in common some electron transport components, such as the plastoquinone pool (2). Whether thylakoid membranes of existing chloroplasts have kept relics of this ancestral respiration and what could be the role of plastid respiration in the bioenergetics of modern chloroplasts are intriguing questions that have been a subject of controversy during the past few years (3–6).

From the effects of respiratory inhibitors such as cyanide, CO or salicylhydroxamic acid (SHAM), on chlorophyll fluorescence transients, it has been suggested that a respiratory electron transport process (called chlororespiration) was occurring in the chloroplast of green microalgae (3). Such a respiratory chain should involve at least two electron transport components in addition to the PQ pool: one performing the nonphotochemical reduction of the PQ pool using stromal reductants and the other allowing reoxidation of reduced PQs and reduction of O₂. However, although the existence of enzymatic systems allowing nonphotochemical reduction of the PQ pool is rather well documented (5, 7–10), the existence of an oxidase operating on the PQ pool has been a matter of debate (6, 11). Moreover, no molecular or biochemical evidence support the existence of a plastidial oxidase in *Chlamydomonas* cells.

Mass spectrometry using ¹⁸O-labeled O₂ on PSI-deficient mutants is a powerful way to determine whether electrons produced at PSII (measured as unlabeled O₂ from water photolysis) can be diverted toward a terminal oxidase consuming O₂. Using this approach, it was reported that, in the absence of PSI, a steady state electron flow occurs in the light from PSII to O₂ (12–13). However, based on the effect of respiratory inhibitors and of uncouplers, it was initially concluded that reducing equivalents were produced by PSII through a $\Delta\psi$ -dependent reaction and subsequently transferred toward mitochondria for reoxidation (12, 14). Using 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea and *cyt b₆f* mutants, it was shown that the light-induced electron flow involved the PQ pool but not the *cyt b₆f*, and it was hypothesized that it relied on a putative NAD(P)H dehydrogenase functioning in a reverse mode (12).

In the present paper, we have reinvestigated this question by measuring electron transfer reactions occurring in the absence of PSI in *Chlamydomonas* strains lacking either the PSI complex or the *cyt b₆f* complex. These strains have been obtained

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ To whom correspondence should be addressed: Commissariat à l'Énergie Atomique, Centre de Cadarache, DEVN/LEP, Batiment 161, St. Paul Lez Durance 13108, France. Tel.: 33 4 42 25 4366; Fax: 33 4 42 25 6265; E-mail: laurent.cournac@cea.fr.

¹ The abbreviations used are: PSII, photosystem II; PSI, photosystem I; PQ, plastoquinone; *cyt*, cytochrome; SHAM, salicylhydroxamic acid; WT, wild type.

through chloroplast deletion of entire coding regions and are therefore particularly stringent. By performing measurements on chloroplast fractions and using different inhibitors, we show that electrons provided by PSII can be diverted at a significant rate toward a chloroplast oxidase. The nature of this oxidase, which is sensitive to propyl gallate but poorly sensitive to cyanide and insensitive to azide, CO, and SHAM, is discussed in relation to the properties of a recently discovered chloroplast quinol oxidase implicated in carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis* (15, 16).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant Material.—*C. reinhardtii* cells were grown in a Tris acetate-phosphate medium (17) in 500-ml Erlenmeyer flasks for heterotrophic growth. Algal cultures were maintained at 25 °C under continuous agitation and low illumination (about 1 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The wild-type (WT) strain used in this work was isolated as a *mt*⁺ segregant of a cross between two strains isogenic to the 137c strain (17). The original deletions of *psaA* and *psaB* were made in this strain (18). Biobalistic chloroplast transformations were performed with plasmids designed to delete the *psaA* and *psaB* genes, and homoplasmy of these deletions was assessed by polymerase chain reaction reactions (18). The *aadA* cassettes used to delete *psaA* or *psaB* were flanked by direct repeats; homologous recombination between these repeats has the effect of removing the *aadA* cassette leaving one repeat behind (18). All experiments herein used the *aadA*-less strains to remove any possible differences that could be caused by expression of the aminoglycoside-adenyltransferase enzyme in the chloroplast. Marker recycling allowed us to perform subsequent transformations with the *aadA* cassette. The *psaAD petAD* strain was constructed by transforming the *psaAD-1* with a plasmid to delete the *petA* gene (19).

The *Chlamydomonas MUD2* mutant resistant to myxothiazol (20) was generously supplied by Dr. P. Bennoun. The *psaBD MUD2* double mutants were produced by sexual crosses. The cell wall-less strain *ce840* (*mt*⁻ *cw10*; *Chlamydomonas* stock center, Duke University) was crossed to the *psaBD* strain, and *cw10 psaBD* segregants were selected and verified by phenotypic and polymerase chain reaction analysis.

Cell Breaking, Chloroplasts, and Thylakoids Isolation.—Prior to plasmid isolation, the cells were harvested, centrifuged (600 $\times g$, 5 min), and washed once with 15 mM HEPES-KOH, pH 7.2. Chloroplast and thylakoid isolation from cell wall-less cells was conducted at 4 °C following the procedure exposed in Ref. 21 (slightly modified). After centrifugation in the washing medium (600 $\times g$, 5 min), the pellet (around 5 $\times 10^8$ cells) was resuspended in 10 ml of buffer A (0.3 M sorbitol, 50 mM HEPES-KOH, pH 7.8, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl_2) supplemented with 1% bovine serum albumin. The suspension was introduced in a Yeda press chamber and incubated under N_2 at 4 bars during 3 min. The pressurized cells were released slowly, and the lysate was placed on top of a 40%/60%-Percoll step gradient in buffer A with 0.1% bovine serum albumin. After centrifugation in a swing-out rotor at 4000 $\times g$ for 20 min, chloroplasts were collected from the interface, and thylakoids were collected from the top of the gradient. Both fractions were diluted in 20 ml of buffer A and centrifuged for 3 min (600 $\times g$ for chloroplasts, 1500 $\times g$ for thylakoids). The pellets were resuspended in 300–500 μl of buffer A and stored on ice until used in the experiments. O_2 exchange assays were conducted in buffer A without bovine serum albumin.

Permeabilized cells were obtained obtaining from *cw*⁺ strains following a protocol adapted from Ref. 22. Cell disruption was conducted in a Yeda press following the same procedure as for cell wall-less algae except that N_2 pressure was set at 12 bars. Permeabilized cells were collected by centrifugation (600 $\times g$, 3 min), washed in 20 ml of buffer A, and centrifuged again (600 $\times g$, 3 min). The pellet was resuspended in buffer A and stored as above.

Thylakoids from *cw*⁺ cells were obtained through disruption in a French press chamber of the cells at 5000 psi in buffer A plus 1% bovine serum albumin (2 runs). After disruption, broken or intact cells and heavy parts were discarded by centrifugation (600 $\times g$, 3 min). The supernatant was then centrifuged at 3000 $\times g$. The pellet (thylakoid fraction) was treated as above.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Immunodetection.—The portion of the *Arabidopsis* IMMUTANS cDNA (15) coding for the entire mature peptide was polymerase chain reaction-amplified using oligonucleotides based on the cDNA sequence and extended by a *Bam*HI (upstream oligonucleotide) or a *Pst*I (downstream oligonucleotide) restriction site. After restriction digestion, this polymerase chain reaction fragment was in-frame inserted in the *Escherichia coli* expression vec-

tor pQE31 (Qiagen) cleaved using the same enzymes. The recombinant protein (IM), which possesses a 6xHis tag, was produced in *E. coli*, purified according to supplier recommendations, and used to raise polyclonal antibodies (anti-IM) in rabbit. Antibodies were purified first by using caprylic acid (23), which precipitates most serum proteins with the exception of IgG, and then by immunoaffinity using IM immobilized on a nitrocellulose filter (24).

Denaturing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described by Laemmli (25) using 13% polyacrylamide gels. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (26) and probed with the purified anti-IM antiserum.

Measurement of Oxygen Consumption.—*E. coli* cells were grown in M9/glycerol medium until $A_{600} = 0.3$. Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside was then added to induce expression of the recombinant gene during 3 h. After lysis and elimination of the debris, membranes were recovered upon centrifugation at 100,000 $\times g$ for 1 h. Pelleted membranes were resuspended in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.75 M sucrose. Oxygen consumption was measured in a Clark O_2 electrode chamber (Hansatech). A typical assay contained 100 μg of membrane protein in the following buffer: 50 mM Tris-maleate, pH 7.5, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA.

Protein and Chlorophyll Determinations.—Protein content was determined according to Lowry *et al.* (27) using a calibration curve obtained with bovine serum albumin. Chlorophyll content was measured by the method of Lichtenthaler and Wellburn (28).

Mass Spectrometric Measurement of Gas Exchange.—Chloroplast extracts were resuspended in medium A up to 1.5 ml in the measuring chamber. For measuring O_2 exchange on whole cells, algal cultures were harvested in exponential growth phase, centrifuged, washed, and resuspended in either minimal medium (13) or in buffer A. 1.5 ml of the suspension was placed in the measuring chamber. No difference in photosynthetic activity being induced by using one or the other medium, we used buffer A for whole cells experiments shown in this paper. Dissolved gases were directly introduced in the ion source of the mass spectrometer (model MM 14–80, VG instruments, Cheshire, UK) through a Teflon membrane. For O_2 exchange measurements, the sample was purged with N_2 to remove $^{16}\text{O}_2$, and $^{18}\text{O}_2$ (95% ^{18}O isotope content, Euriso-Top, Les Ulys, France) was then introduced to reach an O_2 concentration close to the equilibrium with air. Light was supplied by a fiber optic illuminator (Schott, Main, Germany) and neutral filters were used to vary light intensity. Unless specified, experiments shown here were performed at 300 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ incident light. All gas exchange measurements were performed at 25 °C. The chloroplast extracts were used as quickly as possible after extraction.

Amperometric Measurements.—Cells were harvested during exponential growth by low speed centrifugation (500 $\times g$) and resuspended in a 50 mM Tris buffer (pH 7.2) containing 1 mM sodium acetate and 0.1 M KCl to provide a sufficient conductivity for the amperometric measurements. Flash-induced oxygen exchange measurements were performed using a bare platinum electrode system as described in Ref. 29. The cells were allowed to settle on the electrode for about 30 min before measurements were made. Oxygen was flushed at the surface of the sample to maintain a sufficient oxygen concentration at the algal level. The electrode system was covered by a conic reflector in which an aperture for a xenon flash was adapted. A xenon flash (EG and G, Wellesley, MA, model FX 201, 2- μs duration) was used to provide flash illumination. The oxygen signal was recorded on the screen of an oscilloscope (Tektronix, Wilsonville, OR).

RESULTS

When PSI-deficient algae are illuminated, simultaneous O_2 production by PSII (monitored as $^{16}\text{O}_2$ release resulting from water photolysis) and stimulation of O_2 uptake are observed using ^{18}O -labeled O_2 and mass spectrometry (13, 30). Because the light-dependent O_2 production and the light-stimulated O_2 uptake are of the same amplitude, illumination of PSI-deficient strains does not provoke any change in the apparent rate of O_2 uptake assayed without isotopic labeling (using a Clark-type electrode for instance). We found that the maximal light-dependent O_2 production by PSII measured in different PSI-deficient mutants was relatively constant when normalized to the number of cells (250–350 $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} 10^{-9}$ cells) or to the amount of protein (8–13 $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein). As previously reported in nuclear mutants deficient in PSI (12), we found that 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, an in-

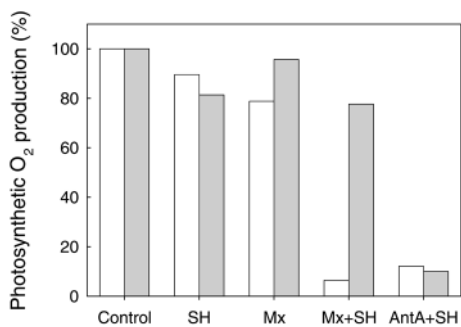


FIG. 1. Effect of the mitochondrial inhibitors myxothiazol, antimycin A, and SHAM on PSII-driven O₂ production (measured from ¹⁶O₂ release in a ¹⁸O₂-enriched medium using mass spectrometry) in intact *Chlamydomonas* mutant cells deficient in PSI. Measurements were performed in the strain *psaBΔ* (open bar) and in double mutant *psaBΔ MUD2* deficient in PSI and carrying mitochondrial resistance to myxothiazol (closed bar). Myxothiazol (Mx) was used at a concentration of 4 μM, SHAM (SH) at a concentration of 0.8 mM, and antimycin A (AntA) at a concentration of 4 μM. Light intensity during measurements was 300 μmol of photons m⁻² s⁻¹. Results are expressed as a percentage of the activity measured in the absence of inhibitors.

hibitor blocking photosynthetic electron transfer between Q_A (the primary quinone acceptor of PSII) and Q_B (the secondary quinone acceptor), strongly inhibited the PSII-driven oxygen production. Also, the PSII-dependent electron flow was observed in the absence of the cyt *b₆f* complex in a *Chlamydomonas* double transformant *psaAΔ-petAΔ* lacking both PSI and cyt *b₆f*.

As reported earlier (12), the PS II-dependent pathway was sensitive to the presence of inhibitors of mitochondrial respiration (Fig. 1). Simultaneous addition of myxothiazol (an inhibitor of the mitochondrial cyt *bc₁* complex) and of SHAM (an inhibitor of the alternative oxidase) inhibited both dark respiration and the PSII-dependent electron flow, whereas myxothiazol or SHAM alone inhibited neither respiration nor photosynthetic oxygen evolution. The effect of the inhibitors on PSII activity could be the consequence of either the mitochondrial inhibition or a synergistic effect of myxothiazol and SHAM on chloroplast processes. To identify clearly the site of action of myxothiazol, we introduced a mitochondrial cyt *b* gene conferring resistance to myxothiazol (*MUD2*; Ref. 20) into a strain deficient in PSI (*psaBΔ*). In this strain, myxothiazol had no effect either on the PSII-driven electron flow or on respiration when added alone or in combination with SHAM (Fig. 1). When myxothiazol was replaced by antimycin A, another inhibitor of the cyt *bc₁* complex acting at a distinct site, the inhibition was again observed. The same results were obtained using a *psaAΔ MUD2* strain (not shown). This clearly shows that the effect of myxothiazol on the PSII-dependent flow is specifically related to the inhibition of mitochondrial respiration.

The sensitivity of the photosynthetic flow to inhibition of mitochondrial activity can be interpreted in two different ways. As initially proposed by Peltier and Thibault (12), the light-stimulated O₂ uptake may be located in mitochondria, with reducing power produced at PSII being transported to mitochondria by means of metabolic shuttles. Another possibility would be that O₂ uptake occurs in the chloroplast but is indirectly affected by the metabolic changes resulting from mitochondrial inhibition. To distinguish between these two hypotheses, we investigated O₂ exchange using ¹⁸O₂ and mass spectrometry in chloroplast fractions. Chloroplast isolation is rather difficult in *Chlamydomonas* because of the presence of a cell wall and the large size of the chloroplast, leading to chloroplast disruption when sufficient force is used to break the

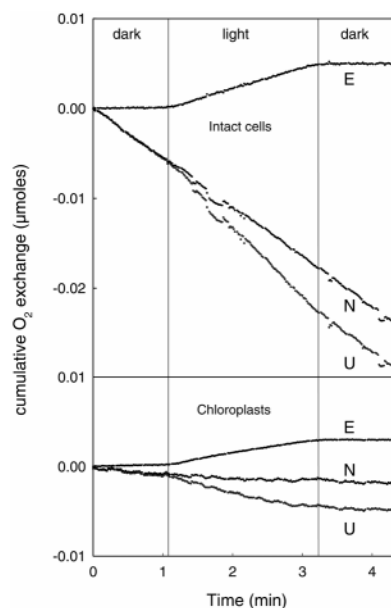


FIG. 2. Oxygen exchange in intact cells and chloroplasts of the *cw10 psaBΔ* strain. Results are shown as cumulative μmoles of O₂ exchanged in the measurement vessel as a function of time. Chlorophyll concentration was set to 20 μg ml⁻¹ in both experiments. Evolution of O₂ by PSII (calculated from ¹⁶O₂ release) is represented as positive values and uptake (calculated from ¹⁸O₂ consumption) as negative values. Transitions between light (300 μmol of photons m⁻² s⁻¹) and dark periods are indicated by vertical lines. E, PSII-driven oxygen evolution; U, gross oxygen uptake; N, net oxygen exchange (as it would be recorded using an oxygen electrode).

algal cell. For this reason, we constructed a *Chlamydomonas* strain deficient in both PSI and cell wall biosynthesis by crossing *cw10* (a cell wall-less strain) with *psaBΔ7* (PSI-deficient). In this strain, isolation of chloroplasts was possible using mild Yeda press disruption (21). O₂ exchange activity was measured in chloroplasts and in thylakoids following fractionation of disrupted cells on a Percoll gradient.

Both chloroplast and thylakoid fractions exhibited a significant light-driven O₂ production by PSII (measured from ¹⁶O₂ release in the medium), which averaged (on a chlorophyll basis) around 60 and 50%, respectively, of that measured in whole cells (Fig. 2). In both chloroplasts and thylakoids, like in intact cells, O₂ evolution by PSII was accompanied by a stimulation of O₂ consumption (Fig. 2). In all systems tested, light-induced O₂ production and stimulation of O₂ uptake were of the same amplitude. To check whether the activity of electron transport measured in chloroplast fractions (particularly O₂ uptake) was relying on contaminating mitochondria, we tested the sensitivity of the photosynthetic flow to mitochondrial inhibitors. We found that neither PSII-driven O₂ production (Fig. 3) nor light-dependent O₂ uptake (not shown) measured in isolated chloroplasts or thylakoids were significantly affected by the simultaneous addition of myxothiazol and SHAM, thus showing that electron transport was not relying on contaminating mitochondria.

In another set of experiments, we checked whether the photosynthetic activity of chloroplast fractions could also be characterized in mutants possessing a cell wall (Fig. 3). We used the *psaAΔ petAΔ* strain and prepared thylakoids by French press disruption. Maximal electron transport activity in these thylakoids represented about 24% of that measured in intact cells. Noticeably, this activity was fully insensitive to myxothiazol and SHAM (Fig. 3 and Table I). In parallel experiments, *psaAΔ petAΔ* cells were permeabilized using Yeda press disruption, which should better preserve chloroplast structures and keep

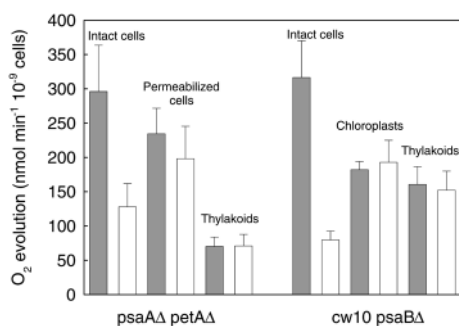


FIG. 3. O_2 production by PSII in photosynthetically active fractions prepared from PSI-deficient mutants; effect of myxothiazol ($4 \mu\text{M}$) and SHAM (0.8 mM). PSII activity was measured by $^{16}O_2$ production in a $^{18}O_2$ -enriched medium using mass spectrometry. In the *psaAΔ petAΔ* strain (deficient in PSI and in the *cyt b₆f* complex) measurements were performed on "intact cells," on "permeabilized cells" resulting from mild Yeda press disruption, and on "thylakoids" resulting from French press disruption. In the double mutant *cw10 psaBΔ* deficient in PSI and cell wall-less, measurements were performed on intact cells and on chloroplast fractions resulting from Yeda press disruption and separation on a Percoll gradient. Two fractions were analyzed: a "chloroplast" fraction and a "thylakoid" fraction. Number of cells was determined visually on intact algae by counting in Malassez vessels; for the fractions, an "equivalent" number was estimated by comparing chlorophyll concentrations in the extracts and in the intact cells sample. Light intensity during measurements was $300 \mu\text{mol of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Closed bar, controls; open bar, measurements performed in the presence of myxothiazol ($4 \mu\text{M}$) and SHAM (0.8 mM).

TABLE I

Effect of different inhibitors and reactive oxygen species scavengers on photosynthetic activity of thylakoids from *Chlamydomonas* mutants deficient in PSI and *cyt b₆f*

Measurements of O_2 production by PSII were performed by monitoring $^{16}O_2$ release, using $^{18}O_2$ and mass spectrometry, on thylakoids prepared from the *psaAΔ petAΔ* mutant strain. Light intensity was $300 \mu\text{mol of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, and the temperature was 25°C . Inhibitions are expressed as a percentage of the gross O_2 evolution rate measured in the absence of inhibitors (around $70 \text{ nmol of } O_2 \text{ min}^{-1} 10^{-9} \text{ cells}$). There were at least three replicates per inhibitor; nonsignificant ($p > 0.05$) effects are shown as ns.

Treatment	Inhibition of photosynthetic O_2 production % of control
3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea ($10 \mu\text{M}$)	>95
Dibromothymoquinone ($1 \mu\text{M}$)	ns
Myxothiazol ($20 \mu\text{M}$)	ns
SHAM (4 mM)	ns
Myxothiazol ($4 \mu\text{M}$) + SHAM (0.8 mM)	ns
Antimycin A ($20 \mu\text{M}$)	ns
KCN (1 mM)	ns
KCN (5 mM)	15
CO ($3\% \text{ v/v eq}$)	ns
NaN_3 (5 mM)	ns
Propyl gallate (1 mM)	90
Ascorbate (5 mM)	ns
Superoxide dismutase ($500 \text{ units ml}^{-1}$) + catalase ($1000 \text{ units ml}^{-1}$)	ns

the mitochondria within the cell. In this system, about 80% of the light-dependent oxygen evolution activity was retained but was almost insensitive to myxothiazol and SHAM, suggesting that the loss of metabolites following cell permeabilization considerably decreased the influence of mitochondria upon chloroplast electron transport (Fig. 3). We conclude from these experiments that the electron flow from PSII to O_2 observed in intact cells occurs within chloroplasts, thus suggesting the existence of a plastidial activity mediating plastoquinol oxidation.

To characterize further the chloroplast PQ oxidation activity, we used several compounds known as inhibitors of either the mitochondrial *cyt c* oxidase (cyanide, azide, and carbon monox-

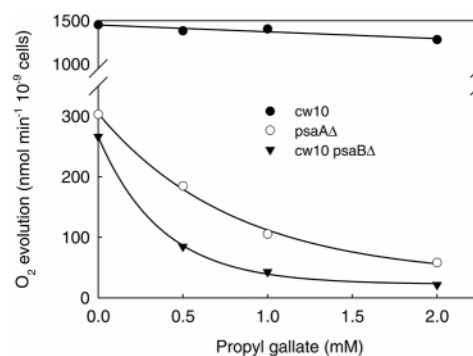


FIG. 4. Effect of propyl gallate on photosynthetic O_2 production measured in intact *Chlamydomonas* cells. ●, *cw10* strain deficient in cell wall but with normal photosynthetic activity; ○, *psaAΔ* strain deficient in PSI; ▼, *cw10 psaBΔ* strain cell wall-less and deficient in PSI. Measurements of O_2 production by PSII were performed using $^{18}O_2$ and mass spectrometry under a light intensity of $300 \mu\text{mol of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

ide), or the mitochondrial alternative oxidase (propyl gallate, SHAM). The effects of these inhibitors were studied on light-driven O_2 production by PSII (measured from $^{16}O_2$ release) and light-dependent O_2 uptake in thylakoid extracts from the *psaAΔ petAΔ* double mutant. KCN, a cytochrome oxidase inhibitor, which has also been described as inhibiting chlororespiration (3, 4, 31) had no effect up to concentrations reaching 5 mM (Table I). NaN_3 (5 mM) and CO ($3\% \text{ v/v eq}$) had no significant effect upon PSII activity or O_2 uptake. PSII-driven oxygen exchange measured in thylakoids from PSI-deficient mutants was insensitive to 4 mM SHAM but was strongly inhibited by 1 mM propyl gallate (Table I). Fig. 4 shows that propyl gallate also inhibited the PSII-dependent O_2 production in intact *Chlamydomonas* cells deficient in PSI. The stimulation by light of O_2 uptake was inhibited by propyl gallate in the same way, whereas noticeably, the oxygen uptake in the dark was not affected by this compound (not shown). The effect of propyl gallate was similar in the cell wall-less *cw10 psaBΔ* strain to that observed in other PSI-deficient mutants, except that comparable inhibitions were found at lower concentrations. This is likely due to better penetration of propyl gallate into cells lacking a cell wall. However, in the same concentration range, this compound had no significant effect on the photosynthetic oxygen production measured in the *cw10* strain (Fig. 4), thus showing that linear electron flow involving both PSII and PSI is not affected by this compound. Because propyl gallate is also known as a potent scavenger of reactive oxygen species (32), we checked the effect of other reactive oxygen species scavengers such as superoxide dismutase (in association with catalase) and α -tocopherol. None of these agents had a significant effect on the PSII-driven O_2 evolution or oxygen uptake (Table I).

Another way to assess the activity of an oxidase branched on the PQ pool is to follow flash-induced perturbations of oxygen exchange that have been related to the activity of chlororespiration (4, 33). When dark-adapted *Chlamydomonas* cells are submitted to a single turnover saturating flash on a rapid oxygen electrode, a transitory elevation of the oxygen level is observed, which has been shown to result not from production of oxygen by PSII, but from a transient inhibition of the chlororespiratory electron flow mediated by PSI (4). A transitory lowering of the oxygen signal in PSI-deficient mutants, interpreted as a transient stimulation of an O_2 uptake process, has also been reported (33). We found that both the flash-induced stimulation of oxygen uptake observed in PSI-deficient mutants and the flash-induced inhibition of uptake in WT are inhibited by propyl gallate (Fig. 5) but are insensitive to SHAM

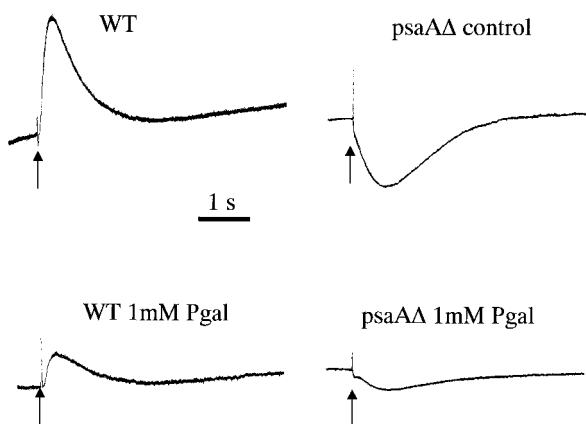


FIG. 5. Effect of propyl gallate on the amperometric signal recorded following the flash illumination of intact *Chlamydomonas* cells. Algae were deposited on a bare O_2 platinum electrode and adapted in the dark for 30 min before measurements. A single turnover saturating flash was fired when indicated by the arrow. Measurements were performed on WT cells and on a PSI-deficient strain (*psaAA*) in the absence or in the presence of 1 mM propyl gallate (*Pgal*).

(not shown). We conclude from these experiments that the oxidase involved in the PSII electron flow to O_2 is also involved in chlororespiration.

The recent discovery in *Arabidopsis thaliana* of a gene encoding for a plastid protein (IM) showing a high homology with the mitochondrial alternative oxidase (15, 16) prompted us to ask if the IM product exhibited a measurable quinol oxidase activity and if a homologue of IM existed in *Chlamydomonas* thylakoids. We tested the potential oxidase activity of IM after expression in *E. coli* cells. After induction of the chimeric gene, the oxidase activity of membrane preparations was assayed. NADH addition initiates oxygen consumption in membranes from both control cells and from cells expressing IM. KCN addition (1 mM) inhibited almost completely oxygen consumption in control membranes. In contrast, a significant cyanide-resistant oxygen consumption was consistently observed in membranes from the IM-expressing cells.² We tested the sensitivity of this cyanide-resistant oxidase activity to propyl gallate (Fig. 6) and found that it was sensitive with an I_{50} around 0.1 mM in this system. The oxidase was at least 10 times less sensitive to SHAM (not shown). In agreement with other data (37), we found that propyl gallate did not interfere with the normal electron flow in *E. coli* membranes (not shown).

Proteins isolated from total and chloroplast *Chlamydomonas* membranes were probed with a purified polyclonal antibody raised against recombinant *A. thaliana* IM. In *Chlamydomonas* thylakoid membranes, the anti-IM antibody recognized a 43-kDa polypeptide, which was almost undetectable in total membranes (Fig. 6, inset).

DISCUSSION

Involvement of a Quinol Oxidase in the Electron Transport Activity from PSII to O_2 Measured in the Absence of PSI—Results shown in this paper demonstrate, in agreement with previous findings (12–13, 30), that significant electron transport activity occurs from PSII to O_2 in PSI-deficient *Chlamydomonas* mutants. From measurements performed on purified chloroplast fractions we show here that the PSII-driven electron flow to O_2 is due to an oxygen uptake process occurring within the chloroplast. Based on the effect of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea and on measurements performed in strains depleted of the *cyt b₆f* complex, we conclude as in Ref.

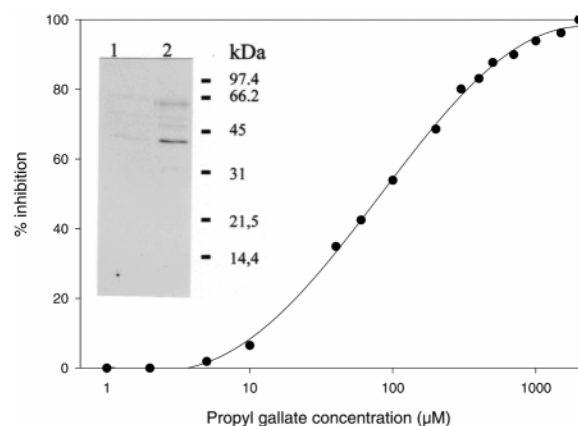


FIG. 6. Titration of propyl gallate inhibition of quinol oxidase activity of the recombinant IM protein expressed in *E. coli*. Inset, immunodetection of a 43-kDa polypeptide by an antibody raised against the *Arabidopsis* IM protein in total cell extract (lane 1) and thylakoid extract (lane 2) of *Chlamydomonas*.

12 that the electron flow between PSII and molecular O_2 involves the thylakoid PQ pool but not the *cyt b₆f* complex.

The stoichiometry of the O_2 exchange (one molecular O_2 evolved for one molecular O_2 consumed) indicates that the final product of oxygen reduction is water: production of one molecular O_2 by PSII involves four electrons, whereas generation of O_2^- would use one electron and generation of H_2O_2 would use two electrons for each molecule of O_2 consumed. Taken together, the lack of sensitivity of the oxygen uptake toward reactive oxygen species scavengers and the fact that water is the final product of O_2 reduction show that the O_2 uptake is not due to plastoquinol autoxidation or peroxidative activity but involves an enzymatic process behaving as an oxidase.

The influence of various inhibitors has given us clues about the nature of the chloroplast oxidase involved in PQ oxidation. The plastid oxidase differs from the mitochondrial *cyt c* oxidase, because azide, CO, and cyanide (at concentrations lower than 5 mM) have no significant inhibitory effect. Different types of oxygen reducing/quinol oxidizing enzymes have been described in the literature. Genes encoding *cyt b₆*-type and *cyt b₆-type* quinol oxidases have been found in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (34). These oxidases are sensitive to cyanide at concentrations higher than what is required to inhibit *cyt aa₃*-type *cyt c* oxidases (generally around 1 mM, Ref. 34). Moreover, the quinol oxidase activity of *Synechocystis* is not sensitive to SHAM or azide (35). To our knowledge, no report has been made of its sensitivity toward propyl gallate. In plant mitochondria, quinol oxidation can be accomplished either by the *cyt bc₁* complex (cyanide-sensitive pathway) or directly to molecular O_2 through an alternative oxidase (cyanide-insensitive pathway). Mitochondrial alternative oxidases constitute another class of quinol oxidases, which have been reported to be inhibited by compounds such as SHAM or propyl gallate (36). We found that propyl gallate, but not SHAM, inhibited the PSII-to- O_2 electron flow in *C. reinhardtii* mutants deficient in PSI. Interestingly, Berthold (37) reported the existence of different mutant forms of the *A. thaliana* mitochondrial alternative oxidase that are resistant to SHAM but remain sensitive to propyl gallate, thus showing that sensitivity to these two inhibitors is separable.

Recently, two laboratories reported the existence in *A. thaliana* of a nuclear gene encoding a chloroplast protein (IMMUTANS-IM) associated with phytoene desaturation (15, 16). Based on the homology of IM with mitochondrial alternative oxidases, it was proposed that this polypeptide fulfills a role of terminal oxidase (15, 16). We have shown, using a functional

² E. M. Josse, A. J. Simkin, J. Gaffé, A. M. Laboré, M. Kuntz, and P. Carol, manuscript submitted.

assay following expression in *E. coli*, that IM is able to confer a significant electron transport activity with O_2 as a terminal acceptor in isolated membranes. As for the PSII-dependent electron transport activity measured in PSI-deficient mutants of *Chlamydomonas*, the activity supported by IM was resistant to cyanide but sensitive to propyl gallate. Interestingly, this activity was much less sensitive to SHAM. Moreover, an antibody raised and purified against the IM recombinant product recognized a 43-kDa polypeptide in *Chlamydomonas* thylakoid membranes, which is close to the 41 kDa reported for IM in *A. thaliana*.² We therefore propose that the 43-kDa polypeptide identified in *Chlamydomonas* thylakoids could be the plastid oxidase whose existence has been deduced from a physiological approach. The isolation of the corresponding *Chlamydomonas* gene as well as the characterization of the encoded product will further test this hypothesis.

Interaction between Photosynthetic Electron Transport and Mitochondrial Activity—Based on the effects of mitochondrial inhibitors and uncouplers on the PSII-driven electron flow, Peltier and Thibault (12) initially concluded that reduction of molecular O_2 was occurring within mitochondria. These authors proposed that NAD(P)H reduction was possible in the absence of PSI through the gradient-dependent reverse functioning of a complex I-like enzyme using plastoquinol as a substrate. According to this interpretation, reducing equivalents produced in the chloroplasts would be transferred to the mitochondria using metabolic shuttles and consumed by the mitochondrial electron transport chain. This explanation appears quite unlikely in light of the results presented here. Indeed, we have shown that the major part of the PSII-driven electron flow (*i.e.* both O_2 production and uptake) could be observed in chloroplast fractions, in the absence of interactions with mitochondria. Moreover, contrary to what was reported on whole *Chlamydomonas* cells, mitochondrial inhibitors such as myxothiazol, antimycin A, or SHAM did not inhibit the PSII-driven electron flow to O_2 measured in chloroplast preparations, indicating that this electron flow does not rely on eventual contaminating mitochondria. Therefore, the effect of mitochondrial inhibitors on the PSII-driven photosynthetic flow would rather result from an inhibition of PSII by a competitive reduction of the PQ pool due to the accumulation of reducing power provoked by inhibition of mitochondrial respiration. In line with this interpretation, significant reduction of the PQ pool was reported in response to inhibition of mitochondrial activity (11).

The possible existence of a respiratory electron transport chain within chloroplasts and its physiological implications have been a matter of debate in the past few years. The discovery of chloroplast genes showing homologies with genes encoding subunits of the mitochondrial complex I (*ndh* genes; Ref. 38) was taken as evidence for the existence of a NADH dehydrogenase complex I in chloroplasts. Several studies have been conducted since then, showing that in higher plants the complex is assembled, functional, and involved in the nonphotochemical reduction of the PQ pool (10, 39–41). However, although chlororespiration and cyclic electron flow around PSI have been extensively studied in *Chlamydomonas* (3, 4, 7), sequencing of the chloroplast genomes of different *Chlamydomonas* species has revealed the absence of *ndh* genes (42). Therefore, a different mechanism would be involved in the nonphotochemical reduction of the PQ pool in *Chlamydomonas*. In this respect, the existence of a NAD(P)H-PQ oxidoreductase distinct from complex I has been reported in chloroplasts of higher plants (9); also, the existence of a succinate dehydrogenase activity that may be involved in PQ reduction has been reported in algal chloroplasts (43). Whatever its nature, the

PQ-reducing enzyme is likely to be involved in the mitochondrial-chloroplast interaction observed in intact cells in our experiments.

Electrogenicity of Chlororespiration—The existence of a quinol oxidase activity together with the existence of activities involved in the nonphotochemical reduction of the plastoquinone pool argues in favor of the existence in *Chlamydomonas* of a chlororespiratory chain driving electrons from stromal donors to O_2 through the PQ pool. We have shown here that the plastid oxidase involved in the electron flow from PSII to O_2 is probably the same enzyme as the chlororespiratory oxidase revealed by measurements of flash-induced oxygen exchange in algae (4, 5, 33, 45). This is in apparent contradiction with conclusions of Bennoun (6) who proposed that previous effects of inhibitors on fluorescence transients could be explained by the existence of metabolic interactions between mitochondria and chloroplasts, therefore questioning both the existence of a chloroplast terminal oxidase and of chlororespiration. According to this author, the electrochemical gradient measured in the dark would not be due to chlororespiration, but rather to an ATP-dependent proton pump different from the CF1F0 ATPase (6, 44). These apparent contradictions can be alleviated if we consider that, according to its probable composition, the chlororespiratory electron transport chain is likely nonelectrogenic. Indeed, alternative quinol oxidases are nonelectrogenic, and activities likely involved in the nonphotochemical reduction of the PQ pool that would be different from complex I would be non- or poorly electrogenic. We therefore propose that chlororespiratory electron transport is non- or poorly electrogenic and, in agreement with Bennoun (6), that the electrochemical gradient in the dark is likely due to another mechanism.

Possible Physiological Functions of Chlororespiration—According to the probable poor electrogenicity of the mechanism, the physiological function of chlororespiration would not be essentially related to ATP generation and would rather appear as a wasteful process. In the dark, electron flow from a stromal donor to the PQ pool and then to molecular O_2 may help in conditions where the cellular redox balance is affected in response to an impairment of mitochondrial activity. During illumination, the PQ pool is likely reduced, thereby preventing donation of electrons from the stroma to the PQ pool. Because inhibition of the PQ oxidase by propyl gallate had no significant effect on linear electron transfer activity measured in WT cells, we conclude that electron flow from plastoquinol to O_2 is only marginal in the light under normal conditions. However, one can imagine that in conditions where the PQ pool is highly reduced (during induction of photosynthesis or in conditions where PSI is inactivated), this electron flow may prevent over-reduction of PQ. Such conditions could occur for instance during simultaneous exposure to cold and high illumination (46). Besides these possible regulatory or protective effects on photosynthetic electron flow, chlororespiration and more particularly the quinol oxidase might be involved in the synthesis of chloroplast compounds requiring redox mechanisms that utilize quinones, as demonstrated in the case of *Arabidopsis* for carotenoid synthesis (15, 47).

Acknowledgments—Drs. J. Laverne, J. L. Montillet, Z. Cerovic, and M. Havaux are gratefully acknowledged for several fruitful discussions throughout this work, as well as P. Carrier, Dr. B. Dimon, and J. Massimino who provided a skillful and long lasting technical assistance. We also thank Dr. P. Bennoun for providing us with the MUD2 strain.

REFERENCES

1. Gray, M. W. (1989) *Trends Genet.* **5**, 294–299
2. Scherer, S. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 458–462
3. Bennoun, P. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 4352–4356
4. Peltier, G., Ravenel, J., and Verméglio, A. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **893**, 83–90

5. Peltier, G., and Schmidt, G. W. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4791–4795
6. Bennoun, P. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1186**, 59–66
7. Godde, D., and Trebst, A. (1980) *Arch. Microbiol.* **127**, 245–252
8. Guedeney, G., Corneille, S., Cui n , S., and Peltier, G. (1996) *FEBS Lett.* **378**, 277–280
9. Corneille, S., Cournac, L., Guedeney, G., Havaux, M., and Peltier, G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 59–69
10. Burrows, P. A., Sazanov, L. A., Svab, Z., Maliga, P., and Nixon, P. (1998) *EMBO J.* **17**, 868–876
11. Gans, P., and R beill , F. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1015**, 150–155
12. Peltier, G., and Thibault, P. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **936**, 319–324
13. Cournac, L., Redding, K., Bennoun, P., and Peltier, G. (1997) *FEBS Lett.* **416**, 65–68
14. Redding, K., and Peltier, G. (1998) in *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J. D., Goldschmidt-Clermont, M., and Merchant, S., eds) pp. 349–362, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
15. Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G., and Kuntz, M. (1999) *Plant Cell* **11**, 1–12
16. Wu, D. Y., Wright, D. A., Wetzels, C., Voytas, D. F., and Rodermel, S. (1999) *Plant Cell* **11**, 43–55
17. Harris, E. H. (1989) *The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, Academic Press, San Diego, CA
18. Fischer, N., Stampacchia, O., Redding, K., and Rochaix J.-D. (1996) *Mol. Gen. Genet.* **251**, 373–380
19. Kuras, R., and Wollman, F. A. (1994) *EMBO J.* **13**, 1019–1027
20. Bennoun, P., Delosme, M., and K ck, U. (1991) *Genetics* **127**, 335–343
21. Rolland, N., Dorne, A. J., Amoroso, G., Sultemeyer, D. F., Joyard, J., and Rochaix, J. D. (1997) *EMBO J.* **16**, 6713–6726
22. Belknap, W. R., and Togasaki, R. K. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 2310–2314
23. Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
24. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
25. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
26. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354
27. Lowry, O. D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275
28. Lichtenthaler, L. H. K., and Wellburn, W. A. R. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* **603**, 591–592
29. Schmid, G. H., and Thibault, P. (1979) *Z. Naturforsch.* **34**, 414–418
30. Redding, K., Cournac, L., Vassiliev, I. R., Golbeck, J. H., Peltier, G., and Rochaix, J.-D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10466–10473
31. Garab, G., Lajko, F., Mustardy, L., and Marton, L. (1989) *Planta* **179**, 349–358
32. Kahl, R., Weinke, S., and Kappus, H. (1990) *Adv. Exp. Med. Biol.* **264**, 283–290
33. Ravenel, J., and Peltier, G. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 57–63
34. Howitt, C. A., and Vermaas, W. F. J. (1998) *Biochemistry* **37**, 17944–17951
35. Buchel, C., Zsiros, O., and Garab, G. (1998) *Photosynthetica* **35**, 223–231
36. Siedow, J. N. (1980) *Plant Physiol.* **65**, 669–674
37. Berthold, D. A. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 73–83
38. Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinoyaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., and Sugiura, M. (1986) *EMBO J.* **6**, 2043–2049
39. Endo, T., Shikanai, T., Sato, F., and Asada, K. (1998) *Plant Cell Physiol.* **39**, 1226–1231
40. Elortza, F., Asturias, J. A., and Arizmendi, J. M. (1999) *Plant Cell Physiol.* **40**, 149–154
41. Sazanov, L. A., Burrows, P. A., and Nixon, P. J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1319–1324
42. Boudreaux, E. R., Otis, C., and Turmel, M. (1994) *Plant Mol. Biol.* **24**, 585–602
43. Willeford, K., Gombos, Z., and Gibbs M. (1989) *Plant Physiol.* **90**, 1084–1087
44. Rappaport, F., Finazzi, G., Pierre, Y., and Bennoun, P. (1999) *Biochemistry* **38**, 2040–2047
45. Peltier, G., Havaux, M., and Ravenel, J. (1995) in *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (Mathis, P., ed) Vol. II, pp. 887–890, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
46. Havaux, M. (1987) *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 735–743
47. Norris, S. R., Barrette, T. R., and Della Penna, D. (1995) *Plant Cell* **7**, 2139–2149

A Plastid Terminal Oxidase Associated with Carotenoid Desaturation during Chromoplast Differentiation

Eve-Marie Josse, Andrew J. Simkin, Joël Gaffé, Anne-Marie Labouré,
Marcel Kuntz, and Pierre Carol

A Plastid Terminal Oxidase Associated with Carotenoid Desaturation during Chromoplast Differentiation¹

Eve-Marie Josse, Andrew J. Simkin, Joël Gaffé, Anne-Marie Labouré, Marcel Kuntz*, and Pierre Carol

Laboratoire de Génétique Moléculaire des Plantes, Université Joseph Fourier and Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche 5575), BP53, 38041 Grenoble cedex 9, France

The Arabidopsis *IMMUTANS* gene encodes a plastid homolog of the mitochondrial alternative oxidase, which is associated with phytoene desaturation. Upon expression in *Escherichia coli*, this protein confers a detectable cyanide-resistant electron transport to isolated membranes. In this assay this activity is sensitive to *n*-propyl-gallate, an inhibitor of the alternative oxidase. This protein appears to be a plastid terminal oxidase (PTOX) that is functionally equivalent to a quinol:oxygen oxidoreductase. This protein was immunodetected in achlorophyllous pepper (*Capsicum annuum*) chromoplast membranes, and a corresponding cDNA was cloned from pepper and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. Genomic analysis suggests the presence of a single gene in these organisms, the expression of which parallels phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase gene expression during fruit ripening. Furthermore, this *PTOX* gene is impaired in the tomato *ghost* mutant, which accumulates phytoene in leaves and fruits. These data show that PTOX also participates in carotenoid desaturation in chromoplasts in addition to its role during early chloroplast development.

Carotenoids have well known biological properties that include light harvesting and protection against photo-oxidation. Carotenoids can be further metabolized for instance to abscisic acid in plant cells and to vitamin A in animal cells (for review, see Cunningham and Gantt, 1998). In plant cells carotenoids are produced in plastids. The main carotenoids in chloroplasts are β -carotene and xanthophylls. In non-photosynthetic chromoplasts the distribution of carotenoids is subject to considerable variation from one species to another (for review, see Bramley, 1997). This ranges from the accumulation of an intermediate in the pathway such as lycopene in ripe tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits to the production of species-specific carotenoids as in pepper (*Capsicum annuum*) fruits.

However, all of these molecules are derived from a common precursor, namely phytoene, a C40 acyclic molecule. Phytoene is subjected to four consecutive desaturation (dehydrogenation) reactions that lead to the formation of lycopene. This latter compound contains the typical chromophore of 11 conjugated double bonds. Phytoene desaturation to ζ -carotene via phytofluene is catalyzed by phytoene desaturase (PDS) (Bartley et al., 1991), and ζ -carotene desaturation to lycopene via neurosporene is catalyzed by ζ -carotene desaturase (ZDS; Albrecht et al., 1995). These enzymes catalyze similar reactions and share significant sequence similarity (Albrecht et al., 1995).

Although these enzymes are active in a heterologous environment, e.g. when produced in *Escherichia*

coli cells (Fraser et al., 1993; Bartley et al., 1999; Breitenbach et al., 1999), they require a number of co-factors in plastids. The first evidence for co-factor requirement was obtained using daffodil flower chromoplasts where it was shown that molecular oxygen and a redox mediator acting between the desaturase and O₂ (Beyer et al., 1989) as well as quinones (Mayer et al., 1992; Schultz et al., 1993) are required. Genetic evidence for quinone requirement was also obtained using Arabidopsis mutants accumulating phytoene (Norris et al., 1995). Furthermore, phytoene desaturation is linked to a respiratory redox chain in daffodil flowers, which surprisingly involves the 23-kD protein from the chloroplastic oxygen-evolving complex (Niegelstein et al., 1995).

It has been recent that the cloning of the Arabidopsis gene *IMMUTANS* has identified a new important factor for phytoene desaturation (Carol et al., 1999; Wu et al., 1999). Inactivation of this gene results in reduced phytoene desaturation and consequently reduced carotenoid content leading to photo-oxidative damage, which results in a variegated phenotype consisting of white and green sectors. White sectors arise from irreversible photo-oxidative damage at an early stage of chloroplast formation (Carol et al., 1999) when carotenoid synthesis is normally increased (Corona et al., 1996). Green sectors originate from cells that avoided irreversible photo-oxidative damage. This clarifies previous data postulating that the *IMMUTANS* gene product is active during an early phase of plant development (Wetzel et al., 1994). The *IMMUTANS* gene product shows limited similarity with mitochondrial alternative oxidases (AOX; for reviews, see Day et al., 1995; Siedow and Umbach, 1995; Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Wagner and Moore, 1997), suggesting that it may

¹ This work was supported by the European Commission DGXII Biotechnology Programme (contract BIO4-96-2077).

* Corresponding author; e-mail marcel.kuntz@ujf-grenoble.fr; fax 33-476-51-4336.

function as a terminal oxidase located within plastids (Carol et al., 1999; Wu et al., 1999).

In this report we monitored the terminal oxidase activity of the *IMMUTANS* gene product after expression in *E. coli*. In addition we examined the involvement of this protein during a particular developmental stage, namely during chromoplast differentiation in pepper and tomato fruits when carotenoid production is enhanced. These data are reinforced by our demonstration that the tomato *ghost* mutant, the phenotype of which resembles *immutans* in leaves but also accumulates phytoene in fruits (Mackinney et al., 1956; Scolnik et al., 1987), is impaired in the corresponding gene.

RESULTS

Catalytic Properties of the *IMMUTANS* Gene Product Expressed in *E. coli*

We tested the potential plastid terminal oxidase (PTOX) activity of the *IMMUTANS* gene product after expression in *E. coli* cells (see "Materials and Methods"). After induction of this chimeric gene by isopropylthio-β-galactoside, cells were harvested and their membranes were isolated. The overexpressed polypeptide (see below) was visible in Coomassie Blue-stained protein gels and could be immunodetected in these membranes (not shown) but not in control membranes (from cells transformed with the cloning vector alone).

To assay for PTOX enzymatic activity, oxygen consumption by these membranes was measured. As shown in Figure 1a, NADH addition initiates oxygen consumption in membranes from both control cells and from cells expressing the putative PTOX. An addition of cyanide (KCN; 2 mM) progressively, but strongly, inhibited oxygen consumption in control membranes. In contrast a significant cyanide-resistant oxygen consumption was consistently observed (in 12 experiments) in membranes from the *IMMUTANS*-expressing cells (Fig. 1, a and b).

To examine the possibility that this cyanide-resistant oxygen consumption could be due to the induction of cytochrome bd oxidase, which is more resistant to cyanide than cytochrome bo oxidase, these experiments were repeated in the presence of 10 mM KCN. Cyanide resistance was also observed in this case (data not shown). Therefore, a possible rise in cytochrome bd oxidase level, induced indirectly by PTOX, does not appear to explain our data.

Furthermore, this cyanide-resistant oxygen consumption was abolished by addition of nPG, an inhibitor of the mitochondrial AOX (Siedow and Umbach, 1995). In the latter case the residual rate of oxygen consumption was similar to that observed in control membranes treated with KCN alone or KCN plus nPG. An addition of nPG to control membranes prior to KCN had little effect (Fig. 1c), which is in agreement with other data (Berthold, 1998). An ad-

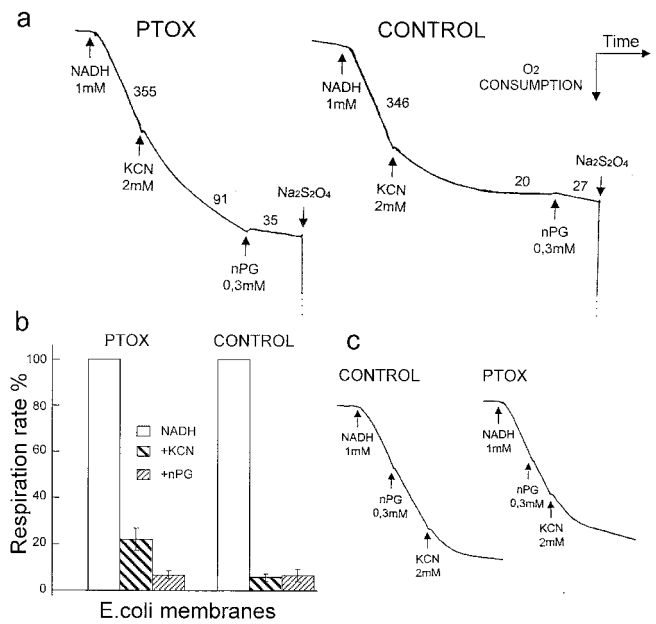


Figure 1. Oxygen consumption in isolated *E. coli* membranes from cells expressing the Arabidopsis *IMMUTANS* gene product (PTOX) and control cells. a, Oxygen uptake was measured using an O₂ electrode after addition of NADH as an electron donor, KCN, and *n*-propyl-gallate (nPG). Dithionite (Na₂S₂O₄) was added at the end of the experiment to verify that the reactions did not proceed to complete oxygen depletion. Numbers refer to oxygen consumption in nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ protein⁻¹ in the linear zone of the traces (when full effect of the added compound was obtained). b, Relative respiration rate after sequential addition of NADH (set as 100), KCN, and nPG. Means of 12 experiments and SE are shown. c, Same as a except that nPG was added prior to KCN. Traces are of the same scale in a given panel.

dition of nPG to PTOX membranes prior to KCN also had little effect (Fig. 1c), suggesting that PTOX cannot efficiently compete with the *E. coli* cytochrome path when the latter is active. This is not unexpected considering that PTOX is not a normal constituent of these membranes. In addition it should be remembered that the engagement of the AOX path in mitochondria is often largely influenced by the inhibition of the cytochrome path (Day et al., 1995).

These biochemical data suggest that the *IMMUTANS* gene product is inserted in *E. coli* membranes where it functions as a terminal oxidase, which bypasses the *E. coli* cytochrome path when this path is inhibited by cyanide. Thus this plastid protein behaves similarly to the mitochondrial AOX (a quinol: oxygen oxidoreductase) when expressed in *E. coli* (Kumar and Söll, 1992; Berthold, 1998).

PTOX Polypeptide Is Present in Fruit Chromoplasts

Antibodies raised against the mature *IMMUTANS* gene product expressed in *E. coli* (as described in "Materials and Methods") immunodetected the PTOX polypeptide expressed in *E. coli* (Fig. 2A, lane 3), but no polypeptide in control (non-recombinant) *E. coli*

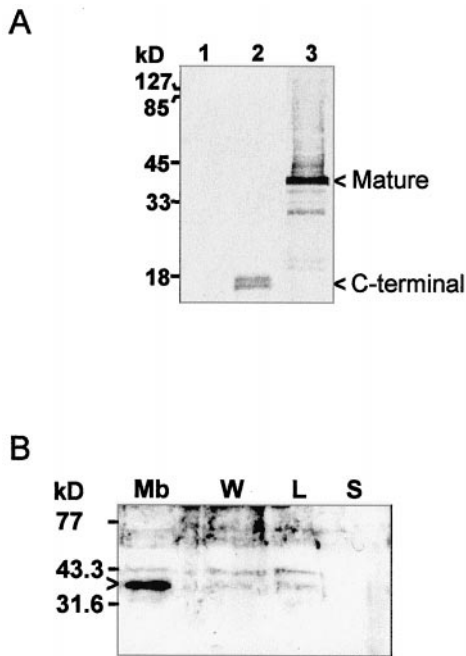


Figure 2. Immunodetection of the IMMUTANS polypeptide after expression in *E. coli* (A) and after sub-fractionation of purified chloroplasts from a ripening pepper fruit (B). A, Three *E. coli* strains were used: control (lane 1), expressing the 130 C-terminal amino acids (lane 2), or expressing the full mature polypeptide (lane 3). *E. coli* cells were grown and total protein recovered as described in "Materials and Methods." In lane 3, the smear above the mature 41-kD band is due to incomplete resolubilization of the IMMUTANS polypeptide from inclusion bodies. B, Achlorophyllous membranes (Mb), membrane-wash fraction (W), low-density lipid fraction (L), and stroma (S) were fractionated as described in "Materials and Methods." Protein samples were separated by SDS/12.5% (v/v) PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Position of size markers is shown on the left. The primary antibody was raised as described in "Materials and Methods." A horseradish peroxidase-coupled secondary antibody was used. Detection was performed colorimetrically (A) or by enhanced chemiluminescence (B). Bands discussed in the text are indicated by arrowheads.

cells (lane 1). The specificity of the antibodies is also shown by the fact that they recognize a polypeptide of shorter size in *E. coli* cells expressing a truncated version (missing the N-terminal coding region) of the gene construct (Fig. 2A, lane 2).

Using this antibody, we investigated the presence of PTOX in fruit chloroplasts as a preliminary step to examine whether PTOX participates also in carotenoid biosynthesis during this developmental stage. Protein gel-blot analysis revealed a polypeptide of approximately 41 kD in chloroplasts isolated from red pepper fruits and purified on Suc gradients. After further sub-fractionation of chloroplasts on Suc gradients, the protein was found in the membrane fraction (consisting of the internal achlorophyllous membrane and the envelope) but not in the soluble fraction (Fig. 2B). The PTOX protein was detected in only very faint amounts (which can be due to contamination) in the membrane wash fraction and in

the low-density lipid fraction that contains globules and other light membranes structures.

Cloning and Characterization of PTOX cDNAs from Pepper and Tomato Fruits

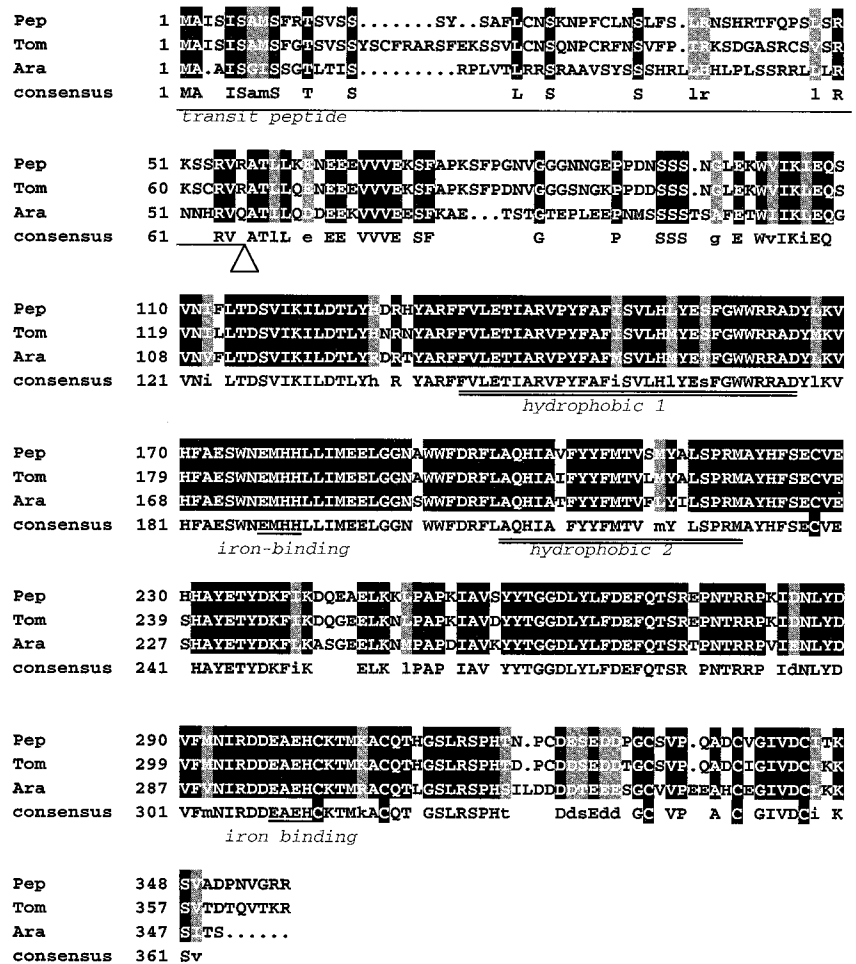
A portion of the Arabidopsis *IMMUTANS* cDNA encoding the mature PTOX protein was used as a hybridization probe to screen a cDNA library from green pepper fruit under non-stringent conditions. All positive clones that were analyzed appeared to be derived from the same gene, as suggested by identical sequences in the 3'-untranslated region. The DNA sequence of a full-length clone has been deposited in the databases (accession no. AF177981). This pepper cDNA was subsequently used to isolate the corresponding cDNA from a red tomato fruit library (accession no. AF177980). Figure 3 compares the deduced amino acid sequences from pepper, tomato, and Arabidopsis.

As expected, the plastid targeting transit peptides showed limited sequence similarity, except for the N-terminal region and the region around the proposed cleavage site ($AT^R/Q-AT$). The mature PTOX polypeptides share 91% identity (95% similarity) between pepper and tomato and 75% identity (85% similarity) between pepper and Arabidopsis. The identity between PTOX and AOX polypeptides is approximately 25%. Sequence alignment of PTOX sequences reveals the presence of two conserved hydrophobic regions separated by a highly conserved hydrophilic segment, an organization also found in AOXs. The N-terminal domain is mainly hydrophilic and contains a long stretch of poorly conserved amino acids. The C-terminal domain is also mainly hydrophilic and contains one conserved motif (EAEH) that matches a putative iron-binding site (ExxH) that is also conserved in AOXs. No other potential iron-binding site is present in this region, but instead one is present in the hydrophilic region separating the two hydrophobic regions as recently proposed for AOXs (Andersson and Nordlung, 1999). In addition the C-terminal region contains six conserved cysteines in PTOX, whereas the rest of the polypeptide is devoid of Cys. This is in contrast with AOX structures in which two conserved cysteines are present in the N-terminal region.

Genomic Structure of PTOX in Tomato

A genomic clone of the tomato *PTOX* gene was isolated after PCR amplification of total genomic DNA using oligonucleotide primers based on the PTOX cDNA sequence. Tomato *PTOX* spans approximately 4.8 kb (accession no. AF177979), whereas the Arabidopsis homolog (Carol et al., 1999) is located on a 2.5-kb genomic DNA fragment. This difference is essentially due to intron sizes (Fig. 4A). Both genes have eight introns the relative distribution of which

Figure 3. Comparison of the deduced amino acid sequences of pepper, tomato, and Arabidopsis PTOX. Amino acids identical in all sequences are boxed in black and shown in uppercase in the consensus line (where Cys are boxed). Residues identical in two sequences but substituted by an equivalent amino acid in the third are boxed in gray and shown in lowercase in the consensus line. The transit peptide, two hydrophobic domains, and two putative iron-binding sites (ExxH) are underlined. The arrowhead shows the likely cleavage site of the transit peptide.



is identical among the two species. The first five introns are longer in tomato than Arabidopsis, however, the last two are shorter in tomato. All introns follow the GT/AG splicing rule. Blast analysis of the different introns indicated that in tomato, 350 bp of the fifth intron show 82% identity with a portion of a DNA fragment of unknown function located on chromosome 6 in tomato between markers APS and GP 79 (accession no. LEU81378).

Southern genomic analysis under stringent conditions indicates that *PTOX* is present as a single gene per haploid genome in tomato (Fig. 4B) and in pepper (data not shown). When these experiments were repeated under low stringent conditions, no additional bands were revealed (data not shown).

Expression of *PTOX*, *PDS*, and *ZDS* Genes during Fruit Ripening in Pepper and Tomato

To assess whether *PTOX* is expressed during ripening, total RNA was extracted from pepper and tomato fruit at different ripening stages. Transcripts of *PTOX*, *PDS*, and *ZDS* were detected following reverse transcriptase (RT)-PCR in the presence of specific oligonucleotides. Appropriate controls were included to verify that the amount of RT-PCR prod-

uct reflects proportionally the amount of the corresponding transcript in the RNA samples (see "Materials and Methods").

In pepper all three genes have a similar pattern of expression during ripening. As shown in Figure 5 (top), the transcript levels show a 4- to 6-fold increase between the immature green stage and the breaker stage (early visible signs of color change). The levels of transcript then remain relatively constant, but with a slight decrease during the red stages. It is interesting that in tomato all three genes when compared with each other also show a similar expression pattern (Fig. 5, bottom). However, this expression pattern is different in comparison with the expression pattern in pepper. In tomato the transcript levels show a 2- to 4-fold increase between the immature green and the mature green stage (fruit of adult size) but dramatically increase at the breaker stage and remain high throughout ripening, showing only a slight decrease in the later stages of ripening.

The Tomato *ghost* Mutant Is Affected in the *PTOX* Gene

Because the tomato *ghost* mutant accumulates phytoene in fruits (Mackinney et al., 1956; Scolnik et al.,

1987), we decided to investigate whether *PTOX* is mutated in this line. We cloned a *PTOX* cDNA from two plants homozygous for *ghost*, and two wild-type plants of the same cultivar. Whereas the sequences from the wild-type plants were identical to the sequence reported above, the sequences from the *ghost* plants showed a frame shift after the Asn-258 codon (Fig. 6a). This cDNA potentially encodes a truncated polypeptide lacking part of the C-terminal region containing the second potential iron-binding motif (Fig. 3). To further confirm that the *ghost* locus corresponds to *PTOX*, 20 seeds from plants heterozygous for *ghost* were germinated. The segregation of this *PTOX* frame-shift mutation and the *ghost* phenotype was compared. As shown in Figure 6b, the PCR-amplified genomic fragment from 100% of the plants showing the *ghost* phenotype (homozygous for *ghost*) contained the frame-shift. In contrast, all plants homozygous for the wild-type *GHOST* gene (showing no *ghost* phenotype in the next generation)

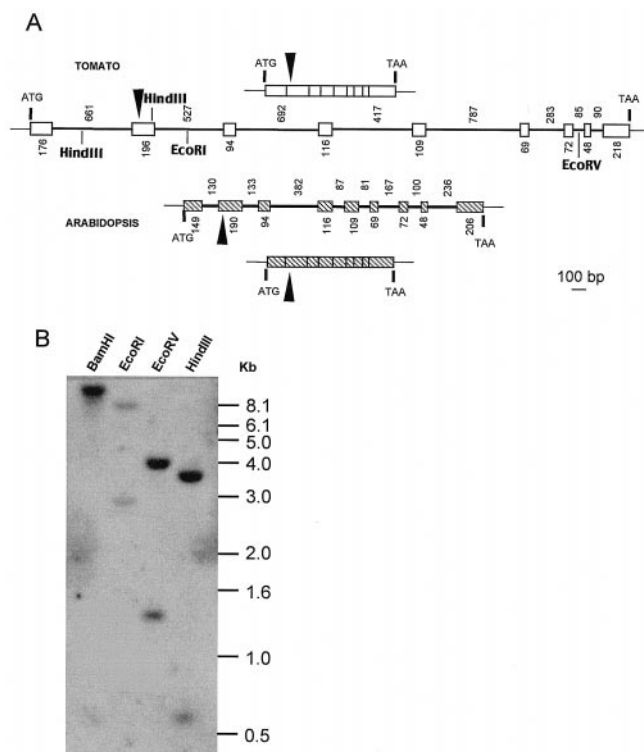


Figure 4. Genomic organization of *PTOX* from tomato and Arabidopsis. A, Schematic representation of cDNAs and genomic fragments from *PTOX*. Upper and lower lines represent transcripts, whereas intermediate lines represent genomic structures. Exons are indicated by boxes, introns by lines. Numbers indicate the length in base pairs of exons (below) and introns (above). Transcription start site (ATG) and stop codon (TAA) are indicated. Putative processing site of the targeting sequence is indicated with a black arrowhead. Cleavage sites for restriction enzymes used in B are shown for the tomato gene. B, Southern-blot analysis of tomato *PTOX*. Tomato DNA was digested with the indicated restriction endonucleases and hybridized with the radiolabeled tomato full-length cDNA probe. Size markers (kilobase pairs) are indicated on the right.

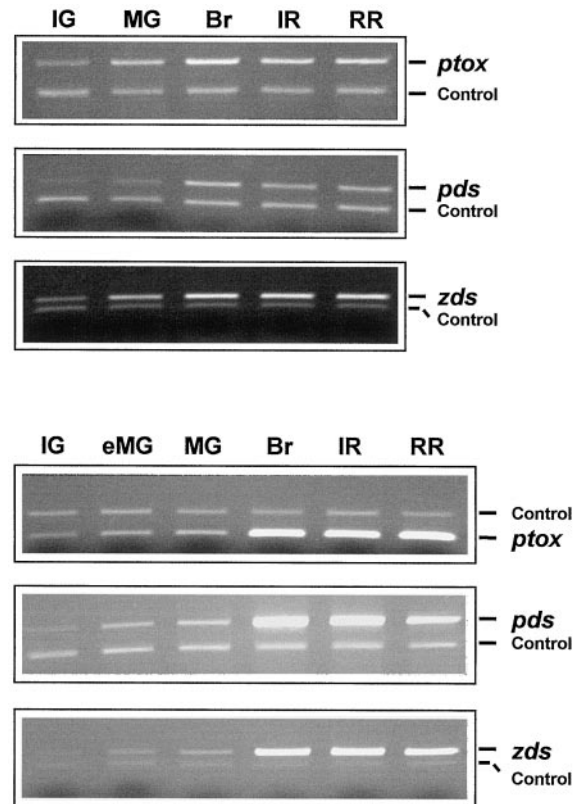


Figure 5. Expression of *PTOX*, *PDS*, and *ZDS* genes during pepper (top) and tomato (bottom) fruit development. mRNA levels were determined by RT-PCR amplification of total cellular RNA. Equal amounts of total RNA were used in each reaction. The PCR products were separated by 1.5% (v/v) agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. Amplification of globin mRNA (added to the RT reaction mix) was used as a control for the RT-PCR reaction (see also "Materials and Methods"). IG, Immature green; eMG, early mature green (adult size); MG, mature green; Br, breaker; IR, intermediate red (4 d after breaker); RR, red ripe (14 d after breaker).

yielded *PTOX* genomic fragments identical to the wild-type sequence.

DISCUSSION

The Arabidopsis *IMMUTANS* Gene Product Behaves Like a Quinol:Oxygen Oxidoreductase

The identification of the *IMMUTANS* gene product as a polypeptide showing limited sequence similarity with mitochondrial AOX was previously taken as an indication that it fulfills the role of a *PTOX* associated with phytoene desaturation (Carol et al., 1999; Wu et al., 1999). We show here using a functional assay, following expression in *E. coli*, that *PTOX* is capable of conferring weak but significant cyanide-resistant electron transport in isolated membranes. The fact that this activity is weak (although the polypeptide is visible in Coomassie Blue-stained gels) and only clearly detectable when the cytochrome path is inhibited is not surprising in such a heterologous assay

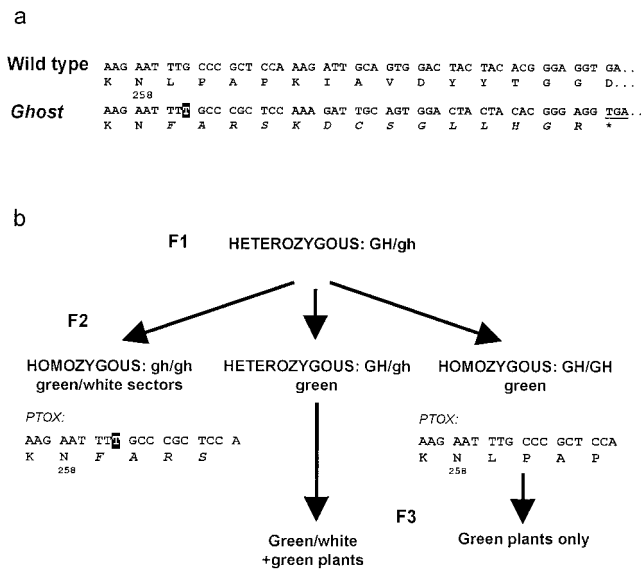


Figure 6. Identification of the tomato *ghost* gene. a, Partial sequence of the PTOX cDNA showing a T insertion (boxed) in *ghost* plants when compared to wild-type and deduced amino acid sequences. The amino acid sequence created by the mutation is shown in italics. b, Cosegregation of the *ghost* recessive phenotype and the mutation in the PTOX genomic sequence from a heterozygous F₁ plant to the F₂ generation. Homozygous F₂ wild-type plants were discriminated from heterozygous plants in the F₃ generation.

based on *E. coli* electron transport chain. It is important to mention that these results are highly reproducible (Fig. 1b). This activity is sensitive to nPG, which is an inhibitor of the cyanide-resistant mitochondrial AOX. Therefore, PTOX appears to be functionally equivalent to a quinol:oxygen oxidoreductase. It should be mentioned that salicylhydroxamic acid, another commonly used AOX inhibitor, was not used in this assay since unlike nPG it has been shown to also inhibit components of the *E. coli* electron transport chain (Berthold, 1998). It should also be mentioned that an effect of nPG on carotenoid accumulation, in developing seedlings for example, could not be assessed since under our experimental conditions nPG delayed germination at 0.1 mM (with no effect on carotenoid accumulation) and prevented germination at higher concentrations (not shown).

Structural Features of PTOX

Hydropathy analysis indicates a similar structure for all three PTOX polypeptides studied here and AOX polypeptides, namely three hydrophilic regions separated by two hydrophobic domains. A model for AOX structure (Siedow and Umbach, 1995) proposes that these hydrophobic regions are helical transmembrane domains. Searches for secondary structures in PTOX sequences consistently predicted helical structures matching almost perfectly these two potential transmembrane domains and most of the hydrophilic region separating them. Additional helical structures

can be postulated after the second hydrophobic domain. Although different predictions were obtained in this C-terminal region using different programs, predictions for AOX and PTOX were again quite similar, despite limited primary sequence similarity.

Therefore, by analogy with the structure proposed by Siedow et al. (1995) for AOX, which is based on structures of binuclear iron proteins such as methane mono-oxygenase, a four-helix structure forming a binuclear iron center can be postulated for the C-terminal region. A weak point for this model in the case of PTOXs is that they do not contain two iron-binding motifs (ExxH) in this region but only the second one. It is interesting that a more recent alternative model has been proposed by Andersson and Nordlung (1999) for AOXs taking into account recent AOX sequences in which the first iron-binding motif in the C-terminal region is not conserved either (like in PTOX). This model proposes that the hydrophobic regions are not membrane spanning. This allows a spatial proximity between the remaining conserved iron-binding motif and a similar ExxH motif in the hydrophilic region separating the hydrophobic regions. It is striking that such an ExxH motif is also conserved in the corresponding position (position 177 in the pepper sequence in Fig. 3) in all PTOX sequences.

It is also notable that conserved cysteines are present in the PTOX C-terminal region, which in AOXs is devoid of Cys. In contrast, plant AOXs have two conserved Cys in their N-terminal region, the first one being involved in the formation of the less active disulfide-linked dimer of the protein and α -keto-acid (e.g. pyruvate) activation (Rhoads et al., 1998; Vanlerberghe et al., 1998). Whether PTOX is subject to redox control or activation by pyruvate will be examined using the functional assay described here. This could provide some indication as to whether the C-terminal conserved cysteines in PTOXs are functionally equivalent to the N-terminal conserved cysteines in AOXs.

Involvement of the PTOX in Carotenoid Biosynthesis in Chromoplasts

The PTOX polypeptide could be immunodetected in plastid fractions from pepper (Fig. 2) and Arabidopsis (not shown) as a polypeptide of approximately 41 kD. This is larger than the theoretical molecular mass of the mature polypeptide (34.3 kD) but is similar to the apparent molecular mass of the mature polypeptide expressed in *E. coli*. This difference may be due to the partially hydrophobic nature of PTOX.

Ripening pepper fruits were chosen because isolation of highly purified chromoplasts is feasible in this case. The PTOX polypeptide was mainly found in the achlorophyllous membrane fraction of these chromoplasts, which is known to contain carotenoid biosyn-

thetic enzymes (Bouvier et al., 1994). Further evidence for the involvement of PTOX in carotenoid biosynthesis in chromoplasts is provided by the cloning of related PTOX cDNAs from pepper and tomato fruits. Since PTOX is encoded by a single gene in all species studied here, it seems likely that the same polypeptide operates during early stages of plastid development as well as late stages, namely chromoplast formation. Gene expression studies have shown that these PTOX genes are induced during fruit ripening. Furthermore, when compared with the PDS and ZDS genes, a similar profile of induction during fruit ripening was observed in the same organism. The expression of PDS obtained here is in agreement with previous reports (Ronen et al., 1999 and references therein). The expression of ZDS during ripening has not to our knowledge been reported to date.

Genetic evidence for the involvement of PTOX in carotenoid biosynthesis in chromoplasts is provided by our data showing that PTOX corresponds to the tomato GHOST gene. Like immutans, the ghost mutant shows variegated green/white leaves and phytoene accumulation in white sectors. In addition, ghost is interesting since it possesses poorly colored petals (compared with the yellow carotenoid-containing wild-type petals) and fruits that do not accumulate the red lycopene pigment but phytoene instead (MacKinney et al., 1956; Scolnik et al., 1987). Despite this lack of carotenoid desaturation, ghost fruits exhibit other ripening features such as softening. These data show that PTOX has a preponderant role in carotenoid accumulation in petal and fruit chromoplasts in addition to its role during early chloroplast differentiation (Wetzel et al., 1994; Carol et al., 1999; Wu et al., 1999).

Does PTOX Act with Both PDS and ZDS Reactions?

In contrast with PDS, no data are currently available demonstrating the involvement of PTOX with ZDS activity. However, this is most likely the case since (a) PDS and ZDS share considerable sequence similarity, (b) they catalyze similar enzymatic reactions, (c) ZDS also uses quinones as cofactors (Breitenbach et al., 1999), (d) no evidence was obtained for a second PTOX gene, and (e) the PDS, ZDS, and PTOX genes are co-expressed when carotenoid biosynthesis is enhanced during fruit ripening.

The data presented here and the availability of antibodies against PTOX represent a new step toward the elucidation of carotenoid desaturation complexes and their mode of action.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials

Pepper (*Capsicum annuum* cv Yolo Wonder) and tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Ailsa Craig) plants were grown under greenhouse conditions. The *ghost* mutant (accession

no. LA0295) and corresponding wild-type line (San Marzano, LA0180) were obtained from the Tomato Genetic Resource Center (University of California, Davis) and grown in shaded conditions.

Chromoplast Isolation and Sub-Fractionation

A pepper fruit at an early ripening stage was ground in extraction buffer (1.65 M sorbitol, 5 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol, and 0.25 M Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane], pH 7.6). The extract was filtered, centrifuged for 5 min at 2,000g, resuspended in extraction buffer, and loaded onto a discontinuous Suc gradient (0.5 M/0.84 M/1.45 M). After 15 min of centrifugation at 60,000g, intact chromoplasts were recovered at the 0.84-M/1.45-M interface. Chromoplasts were lysed by resuspension in 5 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol, and 0.25 M Tris, pH 7.6, and homogenized in a Potter homogenizer. The stromal fraction was recovered by a 100,000g centrifugation. Alternatively, to fractionate the insoluble fraction, the lysed chromoplasts were loaded onto a 0.5-M/0.9-M Suc step gradient and centrifuged 15 min at 60,000g. The low-density lipid fraction was recovered on top of the gradient, whereas the membrane fraction was recovered at the interface. The latter fraction was diluted and repurified by 1 h of centrifugation on a linear 0.5-M/0.9-M Suc gradient. All insoluble fractions were washed and recentrifuged at 100,000g.

Library Screening and Southern-Blot Analysis

A ripening tomato fruit (Kausch and Handa, 1997) and a green pepper fruit cDNA library (Matsui et al., 1996) were screened essentially as described (Albrecht et al., 1995). Tomato genomic DNA was extracted according to Tieman et al. (1992). For Southern analysis, 25 μ g of DNA were digested with restriction endonucleases, electrophoresed on 0.8% (w/v) agarose gel, and transferred to nitrocellulose (Optitrans BA-S 85, Schleicher & Schull, Keene, NH) following standard procedures. Filters were hybridized with a radiolabeled full-length cDNA probe of tomato PTOX. Hybridization was performed at 62°C (high stringency) or 47°C (low stringency) with 10^6 cpm/mL hybridization solution. After hybridization filters were washed in $2\times$, $1\times$, and then $0.1\times$ SSC containing 0.1% (w/v) SDS at 62°C or 47°C.

PCR Amplification of Tomato PTOX Gene

Two sets of primers were used to produce overlapping fragments of the entire coding region (cv Ailsa Craig). One set, T5F (5'-CTAACAACCTTCCCACCTTTGG-3') and T5R, (5'-CAATTTATCGTAAGTCTCGTATGC-3') amplifies 800 bp in the 5' side of the cDNA and 3,910 bp from tomato genomic DNA. A second set, T3F (5'-ATGGCATATCATTTCTCTGAATGTGTGGA-3') and T3R, (5'-GTATATACAGTATAGTTGTCCGC-3') amplifies 540 bp from the 3'-end of the cDNA and 915 bp from genomic DNA. PCR reactions were performed in a 25- μ L reaction volume with

1.8- μg genomic DNA, 0.4 μM of primer, 2 mM MgCl_2 , and Elongase enzyme mixture (Bethesda Research Laboratory [BRL], Gaithersburg, MD). After 3 min at 95°C, PCR amplification was performed by 35 cycles consisting of 30 s at 94°C, 40 s at 50°C, and 2 min at 68°C, followed by a 10-min extension at 68°C.

Amplification of a *PTOX* fragment from *ghost* plants was performed as above using primers T3F and T5R. For cloning the entire cDNA from this mutant, 1 μL of a reverse transcriptase reaction mixture (see below) was submitted to PCR amplification in the presence of 0.1 μM of primers T5F and T3R, 1 mM dNTP, and 1.5 mM MgCl_2 and Elongase. Amplification conditions were as above with an annealing temperature raised to 52°C.

PCR products were cloned in the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI) according to manufacturer's instructions. Sequence analyses were performed using the GCG package (Genetic Computer Group, Madison, WI) and software from Infobiogen (www.infobiogen.fr) or the Pasteur Institute (www.pasteur.fr).

Extraction of RNA

Fruits were ground in a coffee grinder cooled with liquid nitrogen. Ground material was added to a mixture (preheated to 80°C) of extraction buffer (0.1 M Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.1 M LiCl, and 1% [w/v] SDS) and water-saturated phenol and vortexed. Samples were centrifuged, and the aqueous phase was re-extracted with chloroform. The aqueous phase was collected, and RNA was precipitated with 0.5 volumes 6 M LiCl. RNA samples were treated with proteinase K in 10 mM Tris, pH 7.5, and 0.4% (w/v) SDS at 50°C for 30 min, and re-extracted with phenol/chloroform. Leaf RNA was extracted in a similar manner and routinely treated with DNase.

RNA concentration and purity were determined by spectrophotometry and visualized by electrophoresis on formaldehyde/agarose gels stained with ethidium bromide. Samples were checked for DNA contamination by PCR using a 4-fold excess of RNA with respect to the concentration routinely used in the RT-PCR reactions.

Measurement of mRNA by RT-PCR

Reverse transcription was carried out using 250 ng of total RNA. Linearity of the RT reaction was established for RNA amounts between 125 and 500 ng. The reaction mixture included 1 mM dNTPs, 0.5 μM oligo(dT), 20 units RNaseOut (BRL), 0.1 pg of control RNA (rabbit globin mRNA from reticulocyte polyribosomes; BRL), 10 mM dithiothreitol, 1 \times RT buffer (BRL), and 100 units Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (BRL) in total volume of 20 μL . Each reaction was carried out in duplicate. The reaction mixture was incubated for 10 min at 20°C, for 35 min at 37°C, and then for 15 min at 42°C. Duplicate samples were pooled to give a final volume of 40 μL , and aliquots were taken for several parallel PCR amplification.

The PCR mix contained 0.6 to 2.0 μg of each primer (based on sequences from the 3' portion of cDNAs), 1.4 \times *Taq* polymerase buffer, 5 mM MgCl_2 , 0.25 mM dNTPs, 1.5 units *Taq* polymerase, and 8 μL of RT reaction mixture (corresponding to the original amount of 100 ng of RNA) in a total volume of 100 μL . The final concentration of cDNA in the PCR reaction mix therefore corresponded to 1 ng/ μL of the original RNA, and the linearity of the PCR amplification was verified for concentration between 0.5 and 2 ng/ μL (using a sample from the developmental stage that gave the strongest signal). The amplification consisted of 24 cycles of 30 s at 94°C, 20 s at 55°C (50°C for pepper *PTOX*), and 20 s at 72°C.

Gene Construct and Protein Production

The portion of the Arabidopsis IMMUTANS cDNA coding for the entire mature peptide was PCR-amplified using oligonucleotides based on the cDNA sequence and extended by a *Bam*HI (upstream oligonucleotide) or a *Pst*I (downstream oligonucleotide) restriction site. After restriction digestion, this PCR fragment was in-frame inserted in the *Escherichia coli* expression vector pQE31 (Qiagen, Valencia, CA) and cleaved using the same enzymes. The recombinant protein that possesses a 6 \times -His-tag was produced in *E. coli*, purified according to supplier recommendations, and used to raise polyclonal antibodies in rabbit.

Immunodetection

Protein samples were fractionated by SDS/PAGE and electroblotted onto nitrocellulose. Immunodetection was performed using either the horseradish peroxidase conjugate substrate kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) or the enhanced chemiluminescence western-blotting kit (Amersham, Buckinghamshire, UK) as recommended by the suppliers.

Measurement of Oxygen Consumption

E. coli cells (strain XL-1 Blue) were grown in M9/glycerol medium until $\text{OD}_{600} = 0.3$. Isopropylthio- β -galactoside was then added (final concentration 40 μM) to induce expression of the recombinant gene during 3 h. The control strain was grown in parallel. After lysis and elimination of the debris, membranes were recovered upon centrifugation at 100,000g for 1 h. Pelleted membranes were resuspended in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5 and 0.75 M Suc. Oxygen consumption was measured in a Clark O₂ electrode chamber (Hansatech, King's Lynn, UK). A typical assay contained 100 μg of membrane protein in the following buffer: 50 mM Tris-maleate, pH 7.5, 0.2 mM decyl-plastoquinone, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , and 1 mM EDTA.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank E. Charpentier for technical assistance, J.P. Alcaraz for sequencing, and G. Clabault for constant

aid. We are grateful to Dr. A.J. Dorne (University of Grenoble/Commissariat à l'Énergie Atomique) for helpful discussions, to Prof. P.M. Bramley and co-workers (Royal Holloway, University of London) for sharing unpublished sequence information, to Prof. A.K. Handa (Purdue University, West Lafayette, IN) and Prof. K. Matsui (Yamaguchi University, Japan) for their gift of a cDNA library, and to R. Curtis and colleagues (Tomato Genetic Resource Center) for providing tomato seeds.

Received November 30, 1999; accepted April 17, 2000.

LITERATURE CITED

- Albrecht M, Klein A, Huguency P, Sandmann G, Kuntz M** (1995) Molecular cloning and functional expression in *E. coli* of a novel plant enzyme mediating ζ -carotene desaturation. *FEBS Lett* **372**: 199–202
- Andersson ME, Nordlung P** (1999) A revised model for the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett* **449**: 17–22
- Bartley GE, Scolnik PA, Beyer P** (1999) Two *Arabidopsis thaliana* carotene desaturase, expressed in *Escherichia coli*, catalyze a poly-cis pathway to yield pro-lycopene. *Eur J Biochem* **259**: 396–403
- Bartley GE, Vitanen PE, Pecker I, Chamovitz D, Hirschberg J, Scolnik PA** (1991) Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6532–6536
- Berthold DA** (1998) Isolation of mutants of the *Arabidopsis thaliana* alternative oxidase (ubiquinol: oxygen oxidoreductase) resistant to salicylhydroxamic acid. *Biochim Biophys Acta* **1364**: 73–83
- Beyer P, Mayer MP, Kleinig H** (1989) Molecular oxygen and the state of geometric isomerism of intermediates are essential in the carotene desaturation and cyclisation reactions in daffodil chromoplasts. *Eur J Biochem* **184**: 141–150
- Bouvier F, Huguency P, d'Harlingue A, Kuntz M, Camara B** (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular characterization of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J* **6**: 45–54
- Bramley PM** (1997) Isoprenoid metabolism. In PM Dey, JB Harborne, eds, *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, pp 417–437
- Breitenbach J, Kuntz M, Takaichi S, Sandmann G** (1999) Catalytic properties of an expressed and purified higher plant type ζ -carotene desaturase from *Capsicum annuum*. *Eur J Biochem* **265**: 376–383
- Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M** (1999) Mutations in the *Arabidopsis* gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* **11**: 57–68
- Corona V, Aracri B, Kosturkova G, Bartley GE, Pitto L, Giorgetti L, Scolnik PA, Giuliano G** (1996) Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant J* **9**: 505–512
- Cunningham FX, Gantt E** (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 557–583
- Day DA, Whelan J, Millar AH, Siedow JN, Wiskich JT** (1995) Regulation of the alternative oxidase in plants and fungi. *Aust J Plant Physiol* **22**: 497–509
- Fraser PD, Linden H, Sandmann G** (1993) Purification and reactivation of recombinant *Synechococcus* phytoene desaturase from an overexpressing strain of *Escherichia coli*. *Biochem J* **291**: 687–692
- Kausch KD, Handa AK** (1997) Molecular cloning of a ripening-specific lipoxygenase and its expression during wild-type and mutant tomato fruit development. *Plant Physiol* **113**: 1041–1050
- Kumar AM, Söll D** (1992) *Arabidopsis* alternative oxidase sustains *Escherichia coli* respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10842–10846
- Mackinney G, Rick CM, Jenkins JA** (1956) The phytoene content of tomatoes. *Proc Natl Acad Sci USA* **42**: 404–408
- Matsui K, Shibutani M, Hase T, Kajiwara T** (1996) Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett* **394**: 21–24
- Mayer MP, Nievelein V, Beyer P** (1992) Purification and characterization of a NADPH dependent oxidoreductase from chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus*: a redox-mediator possibly involved in carotenoid desaturation. *Plant Physiol Biochem* **30**: 389–398
- Nievelein V, Vandekerckove J, Tadros MH, vonLintig J, Nitschke W, Beyer P** (1995) Carotene desturation is linked to a respiratory redox pathway in *Narcissus pseudonarcissus* chromoplast membranes: involvement of a 23-kDa oxygen-evolving-complex-like protein. *Eur J Biochem* **233**: 864–872
- Norris SR, Barrette TR, DellaPenna D** (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**: 2139–2149
- Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JN** (1998) Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria: identification of the cysteine residue involved in α -keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J Biol Chem* **273**: 30750–30756
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J** (1999) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta*. *Plant J* **17**: 341–351
- Schultz A, Ort O, Beyer P, Kleinig H** (1993) SC-0051, A 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett* **318**: 161–166
- Scolnik PA, Hinton P, Greenblatt IM, Giuliano G, Delano MR, Spector DL, Pollock D** (1987) Somatic instability of carotenoid biosynthesis in the tomato ghost mutant and its effect on plastid development. *Planta* **171**: 11–18

- Siedow JN, Umbach AL** (1995) Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell* **7**: 821–831
- Siedow JN, Umbach AL, Moore AL** (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett* **362**: 10–14
- Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G, Handa AK** (1992) An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids, in tomato fruits. *Plant Cell* **4**: 667–679
- Vanlerberghe GC, McIntosh L** (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 703–734
- Vanlerberghe GC, McIntosh L, Yip JYH** (1998) Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell* **10**: 1551–1560
- Wagner AM, Moore AL** (1997) Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defense mechanism. *Biosci Rep* **17**: 319–333
- Wetzel CM, Jiang C-Z, Meehan LJ, Voytas DF, Rodermel SR** (1994) Nuclear-organelle interactions: the *immutans* variegation mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *Plant J* **6**: 161–175
- Wu D, Wright DA, Wetzel C, Voytas DF, Rodermel S** (1999) The *IMMUTANS* variegated locus of Arabidopsis defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell* **11**: 43–55

**Involvement of a Plastid Terminal
Oxidase in Plastoquinone Oxidation as
Evidenced by Expression of the
Arabidopsis thaliana Enzyme in Tobacco**

Thierry Joët, Bernard Genty, Eve-Marie Josse, Marcel Kuntz,
Laurent Cournac, and Gilles Peltier

Involvement of a Plastid Terminal Oxidase in Plastoquinone Oxidation as Evidenced by Expression of the *Arabidopsis thaliana* Enzyme in Tobacco*

Received for publication, April 12, 2002, and in revised form, May 23, 2002
Published, JBC Papers in Press, June 5, 2002, DOI 10.1074/jbc.M203538200

Thierry Joët^{‡§}, Bernard Genty[‡], Eve-Marie Josse[¶], Marcel Kuntz[¶], Laurent Cournac[‡],
and Gilles Peltier^{‡||}

From the [‡]CEA Cadarache, Direction des Sciences du Vivant, Département d'Ecophysiologie Végétale et de Microbiologie, Laboratoire d'Ecophysiologie de la Photosynthèse, Unité Mixte de Recherche 163 CNRS CEA, Univ-Méditerranée CEA1000, 13108 Saint-Paul-lez-Durance, Cedex and [¶]Laboratoire de Génétique Moléculaire des Plantes, Université Joseph Fourier and CNRS (Unité Mixte de Recherche 5575), BP53, 38041 Grenoble Cedex 9, France

Chlororespiration has been defined as a respiratory electron transport chain in interaction with photosynthetic electron transport involving both non-photochemical reduction and oxidation of plastoquinones. Different enzymatic activities, including a plastid-encoded NADH dehydrogenase complex, have been reported to be involved in the non-photochemical reduction of plastoquinones. However, the enzyme responsible for plastoquinone oxidation has not yet been clearly identified. In order to determine whether the newly discovered plastid oxidase (PTOX) involved in carotenoid biosynthesis acts as a plastoquinone oxidase in higher plant chloroplasts, the *Arabidopsis thaliana* PTOX gene (*At-PTOX*) was expressed in tobacco under the control of a strong constitutive promoter. We showed that *At-PTOX* is functional in tobacco chloroplasts and strongly accelerates the non-photochemical reoxidation of plastoquinols; this effect was inhibited by propyl gallate, a known inhibitor of PTOX. During the dark to light induction phase of photosynthesis at low irradiances, *At-PTOX* drives significant electron flow to O₂, thus avoiding over-reduction of plastoquinones, when photosynthetic CO₂ assimilation was not fully induced. We proposed that PTOX, by modulating the redox state of intersystem electron carriers, may participate in the regulation of cyclic electron flow around photosystem I.

chloroplasts (1). Chlororespiration would involve non-photochemical reduction of the PQ pool and subsequent oxidation by a plastoquinone terminal oxidase. Non-photochemical reduction of PQs is a well established phenomenon that likely occurs during cyclic electron transfer reactions around photosystem I (PS I). A plastid-encoded NADH dehydrogenase (Ndh) complex showing homologies with bacterial complex I has been characterized in thylakoid membranes from higher plants (4–7). Inactivation of some *ndh* genes using plastid transformation of tobacco showed the involvement of the Ndh complex in non-photochemical reduction of PQs (8, 9). It was proposed that the Ndh complex participates in both chlororespiration and cyclic electron transfer around PS I (8–11). A role of the Ndh complex in cyclic electron flow around PS I was recently confirmed by photoacoustic measurements performed in tobacco *ndh* mutants (12). It should be noted that alternate activities, such as a putative ferredoxin-PQ reductase (FQR) (13, 14) or a Ndh-2 type activity may also be involved in these processes (15, 16).

Nevertheless, the involvement of a plastid terminal oxidase in chlororespiration has been the subject of controversy during the last decade (2, 3, 16, 17). Initially, the existence of chlororespiration was based mainly on the effect of respiratory inhibitors such as cyanide and CO on the redox state of the PQ pool (2). However, such effects can be alternatively explained by an inhibition of mitochondrial respiration and the existence of redox interactions between chloroplasts and mitochondria (16–20). Recently, the study of an *Arabidopsis* mutant (*immutans*) showing a variegated phenotype led to the identification of a protein involved in carotenoid biosynthesis (21, 22). Based on sequence homology with mitochondrial alternative oxidases, this protein was suggested to act as a plastid terminal oxidase (PTOX) (21, 23). Expression of *Arabidopsis* PTOX (*At-PTOX*) in *Escherichia coli* conferred a cyanide-resistant O₂ uptake sensitive to propyl gallate, a known inhibitor of alternative oxidases (24, 25). In PS I-less mutants of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, a limited but significant electron flow from photosystem II (PS II) to molecular O₂ was measured. Based on the effects of inhibitors (insensitivity to KCN and CO and sensitivity to propyl gallate) on this process and on the detection of a thylakoid protein that cross-reacted with an antibody raised against PTOX, it was proposed that the chlororespiratory O₂ uptake is because of a *Chlamydomonas* homologue of PTOX (24). In higher plants, an involvement of PTOX in PQ oxidation has not been experimentally evidenced. Based on the study of a reconstituted system, Casano *et al.* (6) proposed that a peroxidase using hydrogen peroxide as an electron acceptor may be involved in chlororespiration.

In photosynthetic organisms like photosynthetic bacteria or cyanobacteria, photosynthesis and respiration operate in close interaction within the same membranes where they share some electron transport components such as the plastoquinone (PQ)¹ pool (1). In chloroplasts, the existence of a respiratory electron transport chain (chlororespiration) in interaction with photosynthesis has been suggested (2, 3), and this activity has been proposed to originate from the cyanobacterial ancestor of

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] Present address: Dept. of Infectious Diseases, St. George's Hospital Medical School, Cranmer Terrace, SW 17 0RE London, UK.

^{||} To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-42257651; Fax: 33-4-42256265; E-mail: gilles.peltier@cea.fr.

¹ The abbreviations used are: PQ, plastoquinone; DBMIB, 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone; Ndh, NADH dehydrogenase complex; PS I and II, photosystem I and II, respectively; PTOX, plastid terminal oxidase; WT, wild type; MES, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid; *At-PTOX*, *A. thaliana* PTOX; RT, reverse transcriptase; Tricine, *N*-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine.

To get further insight into the function of PTOX and in particular to determine whether this protein can achieve quinol oxidation in chloroplasts, tobacco plants constitutively expressing At-PTOX have been generated. We show that At-PTOX facilitates the oxidation of reduced PQs using O₂ as a terminal acceptor.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant Material—Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* var. *petit Havana*) were grown on compost in a phytotron (25 °C day/20 °C night; 12-h photoperiod) under an irradiance of 300 μmol photons·m⁻²·s⁻¹ supplied by quartz halogen lamps (HQI-T 400W/DV, Osram, Germany). Plants were watered with a half-diluted Hoagland's nutritive solution.

Production of Transgenic At-PTOX Tobacco Plants Overexpressing At-PTOX—The *Arabidopsis thaliana* PTOX cDNA (GenBank™ accession number AJ004881) was used as a template for PCR amplification using the primers 5'-CCGCTCGAGCCTGACGGAGATGGCGCGGATTTCAGG-3' and 5'-CCCAGCTCTTATTAACCTTGTAATGGATTCTTTCAGGC-3', respectively, containing an *Xho*I and an *Sac*I restriction site at the 5' and 3' end. The amplified fragment started 9 bp upstream to the coding sequence of the At-PTOX cDNA and contained two stop codons (the start codon and two stop codons are underlined). After digestion, the amplified fragment was introduced in a sense orientation into a plant binary vector (pKYLX71). Expression of At-PTOX was driven by a double sequence of the cauliflower mosaic virus 35S-labeled constitutive promoter (26). The recombinant plasmid was introduced by electroporation into *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58), which was used for tobacco transformation employing the standard leaf disc transformation method (27). Two independent transformation experiments were carried out, and six transformants were recovered on a kanamycin-selective medium (100 mg·liter⁻¹). Two independent transgenic lines (PTOX₁⁺ and PTOX₂⁺), overexpressing high amounts of PTOX, were selected and were self-pollinated. The T1 generation was used for further experiments.

Preparation of Osmotically Lysed Chloroplasts for O₂ Exchange and Chlorophyll Fluorescence Measurements—Leaves were harvested at the end of the night period, and intact chloroplasts were isolated at 4 °C on a Percoll gradient according to a modification of the method described by Mills and Joy (51). Approximately 30 g of leaves were ground in a blender for 2 s in 100 ml of medium A containing 330 mM sorbitol, 50 mM Tricine-NaOH, pH 7.8, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 2 mM ascorbic acid, and 5 mM dithiothreitol. After filtration through 250- and 60-μm nylon net, followed by centrifugation (2000 × *g*, 3 min), the crude extract was resuspended in medium A (dithiothreitol-free) and layered onto a Percoll step gradient formed with two layers of medium A containing 90 and 40% (v/v) Percoll, respectively. After centrifugation in a swing out rotor at 3,500 × *g* for 15 min, intact chloroplasts were recovered from the 40:90% Percoll interphase, washed with 60 ml of medium A, pelleted at 2,000 × *g* for 3 min, and osmotically lysed by resuspension in 10 mM MgCl₂ and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride for 30 min. Lysed chloroplasts were diluted at a final concentration of 200 μg of chlorophyll·ml⁻¹ in 30 mM Hepes-KOH buffer, pH 7.5, containing 0.3 M sorbitol, 5 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM NaHPO₄, 50% (v/v) glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Aliquots of the chloroplast preparation were stored at -20 °C. For O₂ exchange and chlorophyll fluorescence measurements, aliquots were resuspended in 30 mM Hepes-KOH buffer, pH 7.5, containing 0.3 M sorbitol, 5 mM NaCl, and 10 mM MgCl₂. ($F_m - F_0$)/ F_m measured on chloroplasts samples was 0.7 (±0.02, 6 experiments). Anaerobiosis was achieved by addition of glucose (20 mM) and glucose oxidase (2 mg·ml⁻¹) to the chloroplast suspension. Reactive oxygen species generated by the glucose oxidase activity were scavenged by adding superoxide dismutase (500 units·ml⁻¹) and catalase (1,000 units·ml⁻¹).

Mass Spectrometric O₂ Exchange Measurements—For mass spectrometric measurements of O₂ exchange, osmotically lysed chloroplasts (20 μg of chlorophyll·ml⁻¹) were placed in the measuring chamber (1.5-ml reaction volume). The sample was sparged with N₂ to remove ¹⁶O₂, and ¹⁸O₂ (95% ¹⁸O isotope content, Euriso-Top, Les Ulis, France) was then introduced to reach an O₂ concentration close to the equilibrium with air. Dissolved gases were introduced into the ion source of the mass spectrometer (model MM 14-80, VG Instruments, Cheshire, UK) through a Teflon membrane. Light was supplied by a fiber optic illuminator (Schott, Main, Germany) supplying a light intensity of 150 μmol photons·m⁻²·s⁻¹. All gas exchange measurements were performed at 25 °C. The use of ¹⁸O₂ allowed the *in vivo* determination of O₂ evolution by PS II (originating from the photolysis of water which is not enriched) in the presence of O₂ consuming processes.

Chlorophyll Fluorescence Measurements in Chloroplasts and Leaves—Chlorophyll fluorescence was measured at 25 °C using pulse-modulated fluorimeters (PAM 101-103 and PAM 2000, Walz, Effeltrich, Germany for chloroplasts and leaves, respectively). The maximal chlorophyll fluorescence level (F_m) was measured under a 0.8-1-s saturating pulse (about 8,000-10,000 μmol photons·m⁻²·s⁻¹) in dark-adapted leaves, on which the basal fluorescence (F_0) was recorded before the pulse. The maximal photochemical yield of PS II was determined as ($F_m - F_0$)/ F_m . Fluorescence levels F_m , F_s (fluorescence in the light), F_m' (maximal fluorescence in the light, using a saturating pulse), and F_0' (basal fluorescence of light-adapted leaves, recorded after rapid reoxidation of the PQ pool using far-red light) were used to calculate PS II photochemical yield ($F_m' - F_s/F_m'$), non-photochemical quenching ($qN = 1 - F_m'/F_m$), and photochemical quenching ($qP = F_m' - F_s/F_m' - F_0'$) under different irradiances (28). Apparent photosynthetic electron transport rates (μmol electrons·m⁻²·s⁻¹) were estimated as ($F_m' - F_0$)/ $F_m' \times PFFD_1 \times LA \times 0.5$, where PFFD₁ is the incident photosynthetic photon flux density; LA is the leaf absorbance (0.84), and 0.5 the factor accounting for the light partition between the two photosystems.

For chlorophyll fluorescence measurements in stripped leaf discs, leaf samples were placed on a wet paper filter at 25 °C in ambient air. Chlorophyll fluorescence measurements on attached leaves were performed using the gas exchange cuvette of a Licor gas exchange system (LI-6400, Li-Cor Inc, Lincoln, NE) to control leaf temperature (25 °C) and gas atmosphere. Illumination was provided by a homemade red (663 nm) LEDs source.

Inhibitor Treatment of Leaf Discs—Leaf discs were sampled from 5- to 8 week-old plants. After stripping the lower epidermis, leaf discs were soaked in water for 60 min. 2,5-Dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone (DBMIB, 50 μM final concentration) or propyl gallate (1 mM final concentration) was added diluted in methanol (maximal final methanol concentration was 0.5%). Control leaf discs were soaked in water containing methanol. It should be noted that the DBMIB concentration (50 μM) used for leaf discs was much higher than the concentration generally used to obtain specific inhibition of the cytochrome *b₆f* complex on isolated thylakoids (1 μM). Despite this relatively high concentration necessary to obtain an effect in leaf discs, we checked that DBMIB did not act as an electron acceptor.

Photosynthetic CO₂ Fixation Measurements on Attached Leaves—Net CO₂ exchange measurements were performed on attached leaves using a portable gas exchange system (LI-6400, Li-Cor Inc, Lincoln, NE) and a homemade red (663 nm) LEDs source. Leaf temperature was maintained at 25 °C, and leaf vapor pressure deficit was maintained around 0.8 kPa. Various O₂ and N₂ concentrations were provided by mixing pure gases. O₂ concentration was measured using a paramagnetic O₂ analyzer (MAIHAK, Hamburg, Germany). This mixing system was also used for fluorescence measurements in attached leaves. Quantum yield of CO₂ fixation in air and under non-photorespiratory conditions (O₂ 1.5% (v/v); CO₂ 750 μl·liter⁻¹) were calculated from the slope of the linear portion of the light response curve (5 measurements at irradiances between 40 and 80 μmol photons·m⁻²·s⁻¹ and 10 measurements at irradiances between 10 and 100 μmol photons·m⁻²·s⁻¹ for air and non-photorespiratory conditions, respectively).

Electrophoresis and Western Analysis on Chloroplast Fractions—Intact chloroplasts were isolated and purified from leaves using discontinuous Percoll (Amersham Biosciences) gradients as described previously (29). Chloroplasts were osmotically lysed in a solution containing 20 mM MES, pH 6.0, 15 mM NaCl, and 5 mM MgCl₂ and centrifuged for 20 min at 35,000 × *g*. Stroma lamellae and grana membranes were separated following a stacking step carried out as described previously (4).

To prepare total insoluble proteins, tobacco leaves (1 g fresh weight) were frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder with a chilled pestle and mortar. The powder was resuspended in a 5-ml extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) containing 50 mM β-mercaptoethanol and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. After 30 min of stirring (4 °C) and centrifugation (40,000 × *g* for 20 min), the pellet was resuspended in the same buffer containing 1% SDS. After 30 min of stirring (4 °C) and centrifugation (40,000 × *g* for 20 min), proteins contained in the supernatant were precipitated with acetone (80% final concentration).

Denaturing SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (30) using 13% acrylamide (w/v) gels. Proteins were transferred onto 0.45-μm nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell) and were probed with the purified anti-At-PTOX serum (24). Immunocomplexes were detected using the chemiluminescence Western blotting kit (Amersham Biosciences).

Transgene Transcript Analysis—RT-PCR analysis of At-PTOX transcripts was carried out as described previously (25) by amplifying 363

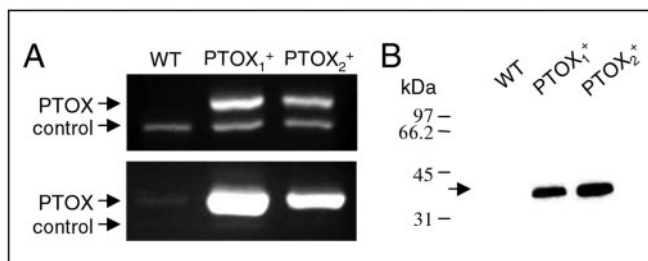


FIG. 1. At-PTOX transcripts and protein levels in transgenic tobacco lines (PTOX⁺). *A*, mRNA levels were determined by RT-PCR amplification of total cellular RNA (*upper panel*) and subsequently re-amplified by a second PCR (*lower panel*). PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% (v/v) agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Total mRNA amounts were standardized beforehand based on fluorescence intensities observed in an ethidium bromide containing RNA gel. Amplification of globin mRNA (added to the RT reaction mix) was used as a control for the RT-PCR to ensure that each sample was reverse-transcribed and amplified equally. *B*, Western analysis was performed on total insoluble leaf proteins (20 μ g of proteins) from WT and two PTOX⁺ transgenic lines, using an anti-At-PTOX antibody.

nucleotides of the *At-PTOX* RNAs using the following primers: 5'-GTG CAY TTT GCI GAR AGC TGG AAT G-3' and 5'-TCA TYG TIT TIC AAT GIT CTG CIT CRT CAT CTC-3', where Y = C + T, R = A + G, and I = deoxyinosine. The amplification consisted of 30 cycles of 30 s at 94 °C, 20 s at 45 °C, and 20 s at 72 °C. The control was the rabbit globin mRNA (supplied by Invitrogen).

Protein and Chlorophyll Determination—Protein content was determined using a modified Lowry method (Sigma). Chlorophyll content was measured according to the method of Lichtenthaler and Wellburn (31).

RESULTS

Expression of At-PTOX in Tobacco—Transgenic tobacco plants expressing the *At-PTOX* cDNA sequence under the control of the doubled constitutive ³⁵S promoter of the cauliflower mosaic virus were generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. Two lines, PTOX₁⁺ and PTOX₂⁺, showing a particularly strong expression of the transgene were selected among six transformant lines and were further studied (Fig. 1A). Note that although no signal was observed in WT tobacco (Fig. 1A, *upper panel*), a faint band was detected after re-amplification (Fig. 1A, *lower panel*). We checked that amplified RT-PCR fragments, including the faint band amplified in WT tobacco (Fig. 1A), cross-hybridized with the *At-PTOX* probe by Southern analysis (data not shown). Antibodies raised against *At-PTOX* were used to characterize *At-PTOX* expression in tobacco transgenic lines using Western analysis. Both transformant lines showed large amounts of a 41-kDa band corresponding to *At-PTOX* in total insoluble leaf proteins (25), whereas no signal was observed in wild type (Fig. 1B). In both lines, *At-PTOX* was targeted to the chloroplasts, thanks to the presence of an N-terminal transit peptide (22), and was found to be associated with thylakoid membranes, essentially stroma lamellae, with only small amounts being found in grana (Fig. 2). Subsequent experiments were performed on both PTOX₁⁺ and PTOX₂⁺ lines and yielded similar results.

Because PTOX has been reported previously (21, 22) to be involved in carotenoid biosynthesis, the pigment content of transgenic plants was analyzed. High pressure liquid chromatography measurements did not reveal any significant difference in chlorophyll or carotenoid content in WT and PTOX⁺ extracts (data not shown). In addition, after transfer to high light conditions, similar amounts of xanthophyll cycle carotenoids (violaxanthin, zeaxanthin, and antheraxanthin) were found in both plants. PTOX₁⁺ and PTOX₂⁺ plants did not show any particular phenotype, and growth was comparable with

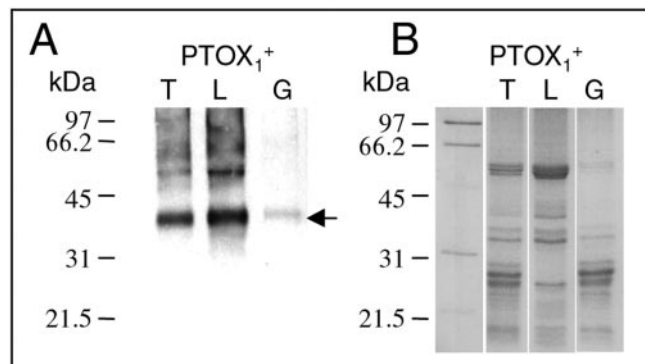


FIG. 2. Membrane localization of At-PTOX in PTOX⁺ tobacco chloroplasts. *A*, Western analysis using an anti-*At-PTOX* antibody, performed on different membrane fractions prepared from tobacco chloroplasts (5 μ g of proteins). *B*, separation of protein fractions (5 μ g of proteins) derived from purified chloroplasts by fully denaturing PAGE revealed by Coomassie Brilliant Blue staining. *T*, thylakoid membrane proteins; *L*, stroma lamellae proteins; *G*, grana proteins.

WT plants when cultivated under normal conditions (not shown).

Expression of At-PTOX Suppresses the Post-illumination *F*₀ Fluorescence Increase—When intact WT leaves were illuminated for a few minutes and then placed in the dark, a transient increase in the *F*₀ chlorophyll fluorescence level occurred (Fig. 3A) (see Refs. 32 and 33). The post-illumination fluorescence transient was absent in PTOX⁺ leaves, and the *F*₀ fluorescence level rapidly decreased after switching off the light (Fig. 3B). As reported previously, the fluorescence increase was absent in *Ndh*-less mutants (Fig. 3C), but interestingly the fluorescence signal decreased more slowly than in PTOX⁺. The absence of a post-illumination chlorophyll fluorescence increase in *Ndh*-less mutants was interpreted as the involvement of the *Ndh* complex in the re-reduction of the PQ pool occurring in the dark after a period of illumination (8, 9, 34). This experiment suggests that like the *Ndh* complex *At-PTOX* was able to modulate the redox state of PQ in the dark, most likely by oxidizing reduced plastoquinones. In agreement with this interpretation, when leaf discs were treated with propyl gallate, a potent inhibitor of PTOX (24), a reversal of the loss of the *F*₀ fluorescence rise was observed (data not shown). Subsequent experiments were designed to characterize the role of *At-PTOX* in PQ oxidation.

Involvement of At-PTOX in the Dark Oxidation of the PQ Pool—In the experiment described in Fig. 4, chlorophyll fluorescence changes were measured in dark-adapted leaves in response to a saturating light pulse. During a pulse, PS II primary electron acceptors were fully reduced, and chlorophyll fluorescence rapidly reached a maximum level (*F*_m). After the light pulse, the chlorophyll fluorescence level decreased in the dark, and this decay was related to the reoxidation of PS II primary acceptors (Q_A) in redox equilibrium with the PQ pool. The fluorescence decay was clearly biphasic. The fast phase was similar in WT and PTOX⁺. On the other hand, the slowly decreasing phase was much faster in PTOX⁺ than in WT, indicating that PQs were more efficiently reoxidized in transgenic plants. Addition of propyl gallate severely slowed down the fluorescence decay, which came close to that observed in WT leaves (Fig. 4B). On the other hand, cyanide (KCN 1 mM) had no significant effect on the fluorescence decay measured in PTOX⁺ (data not shown). In order to check that PS II acceptors were more reduced in WT than in PTOX⁺ during the fluorescence decay shown on Fig. 4A, a control experiment was performed by flashing a second light pulse 4 s after the first pulse (Fig. 5). Under such conditions, because no non-photochemical

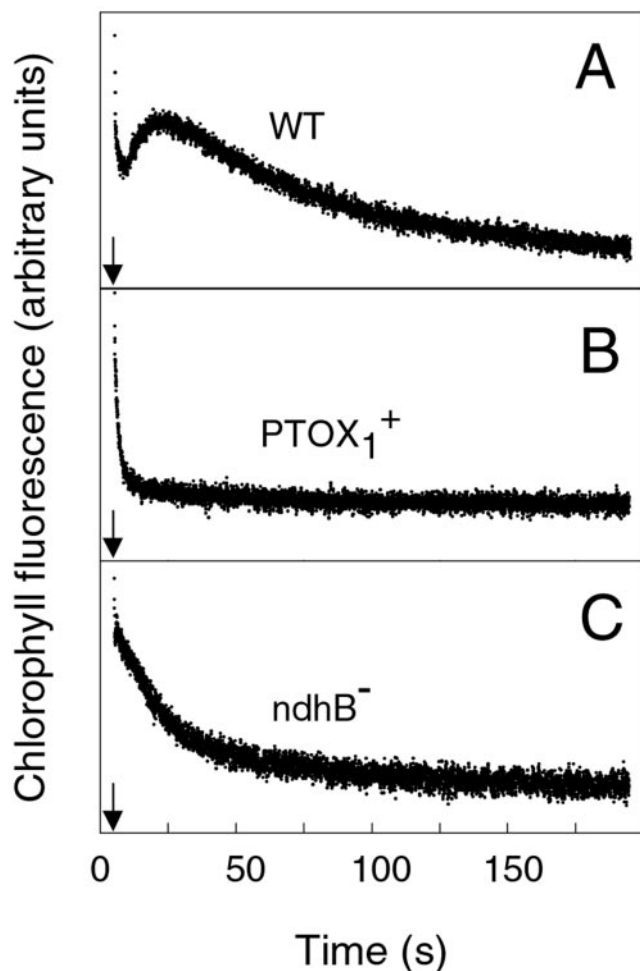


FIG. 3. Apparent " F_0 rise" of chlorophyll fluorescence measured following a light to dark transition in tobacco leaf discs. Light was switched off when indicated (\downarrow) after a 10-min period of actinic illumination ($100 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). A, WT; B, PTOX_1^+ , transgenic tobacco expressing At-PTOX; C, ndhB^- , tobacco plastid transformant inactivated in the ndhB gene, and lacking the Ndh complex.

quenching of F_m occurred, the upper area delimited by the fluorescence induction curve reflected the relative pool size of electron acceptors of PS II, mainly the PQ pool (2, 35). Fig. 5A shows that in WT leaves, 4 s after the first pulse, PS II acceptors are more reduced than in dark-adapted leaves. In contrast, the redox state of PS II acceptors measured in PTOX^+ leaves 4 s after a pulse illumination was close to that measured in dark-adapted leaves (Fig. 5B). We concluded from these experiments that At-PTOX was functional in transgenic tobacco leaves and was able to oxidize efficiently reduced PQs following their reduction by a saturating light pulse. We found that propyl gallate slightly (but in a reproducible manner) affected the slow phase of the fluorescence decay measured in WT leaves (Fig. 4A), possibly indicating the contribution of a putative tobacco PTOX in PQ oxidation.

At-PTOX Is Active in Thylakoids and Used Molecular O_2 as a Substrate—The activity of PTOX on PQ oxidation was then investigated in chloroplast preparations. Addition of exogenous NADH to osmotically lysed chloroplasts isolated from WT leaves increased the apparent F_0 chlorophyll fluorescence level measured under low non-actinic light, indicating an increase in the redox state of the PQ pool (Fig. 6A). Note that in chloroplast preparations, NADH-induced PQ reduction was not mediated by the Ndh complex (Ndh-1), which likely inactivated during

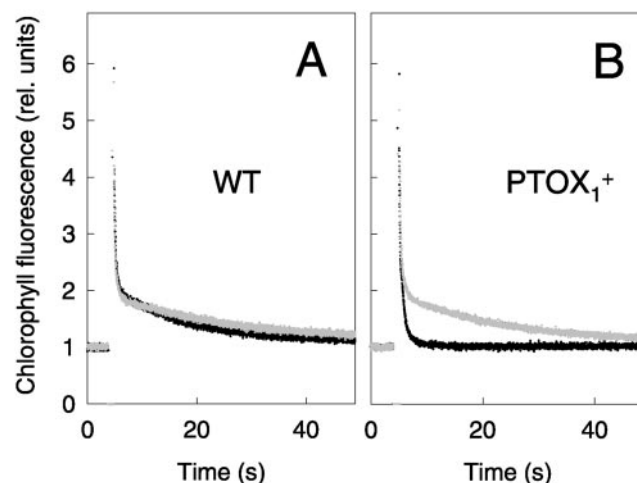


FIG. 4. Chlorophyll fluorescence decay following a saturating pulse of white light measured on dark-adapted tobacco leaf discs. Leaf discs, either treated (gray tracing) or untreated (black tracing) with 1 mM propyl gallate were placed in the dark for 1 h. A, WT; B, PTOX_1^+ . Experimental chlorophyll fluorescence values have been normalized to the F_0 value. The maximal photochemical yield of PS II was 0.823 ± 0.013 in WT and 0.820 ± 0.012 in PTOX^+ (20 experiments).

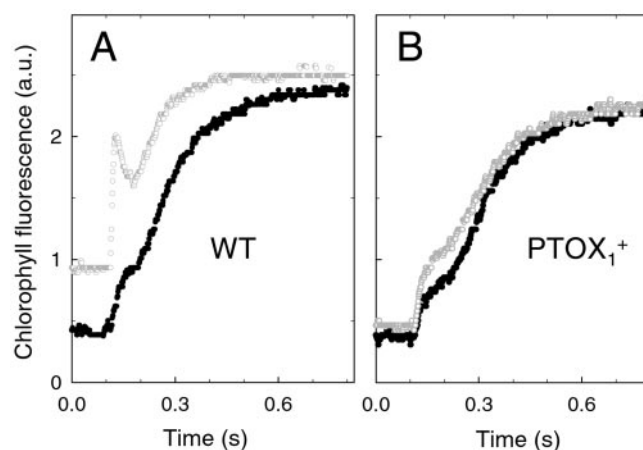


FIG. 5. Chlorophyll fluorescence measurements in response to a high light intensity ($350 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) in tobacco leaf discs either dark-adapted (black tracing) or 4 s following a saturating white light pulse (gray tracing). A, WT; B, PTOX_1^+ .

the extraction procedure, but rather by an alternative (Ndh-2 like) activity (15, 16, 34). Under aerobic conditions, the NADH-induced fluorescence increase was significantly slower in PTOX^+ than in WT chloroplasts (Fig. 6B). Addition of propyl gallate increased the chlorophyll fluorescence level in PTOX^+ chloroplasts, whereas no significant effect could be detected in WT chloroplasts. Removing O_2 from the sample strongly increased the chlorophyll fluorescence signal in a similar manner in both WT and PTOX^+ chloroplasts, and the F_m level corresponded to a full reduction of PQs being rapidly reached (Fig. 6, A and B). This experiment showed that At-PTOX was functional in isolated tobacco chloroplasts and that the redox state of the PQ pool resulted from a competition between reduction by NADH and oxidation by PTOX.

Mass spectrometric measurements of O_2 exchange were then performed on chloroplast preparations using $^{18}\text{O}_2$, to determine which electron acceptor was used during PTOX-mediated PQ oxidation (Fig. 7). In the absence of either cytochrome b_6/f or PS I, an electron flow from PS II to O_2 involving PTOX occurred in *Chlamydomonas* cells (36). When tobacco chloroplasts were treated with DBMIB (a potent inhibitor of the cytochrome b_6/f

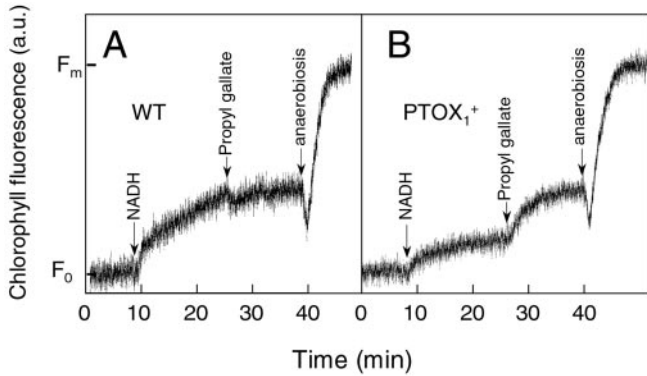


FIG. 6. Effect of exogenous addition of NADH on the chlorophyll fluorescence level measured in non-actinic modulated light on osmotically lysed tobacco chloroplasts prepared from WT or PTOX₁⁺ leaves. When indicated (↓), 2 mM NADH or propyl gallate (1 mM) were added. Anaerobic conditions were obtained by addition of glucose, glucose oxidase, and catalase.

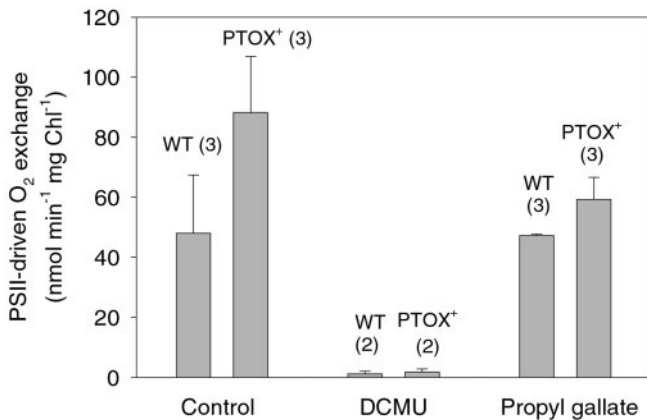


FIG. 7. Mass spectrometric measurements of light-dependent O₂ exchange in chloroplasts isolated from WT and PTOX₁⁺ leaves. O₂ exchange was measured in the presence of ¹⁸O₂ under a light intensity of 150 μmol photons·m⁻²·s⁻¹. Measurements were performed in the presence of DBMIB (1 μM final concentration). 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea or propyl gallate were added at final concentrations of 25 and 8 μM, respectively. Numbers of independent experiments are indicated in brackets.

complex) and illuminated, simultaneous O₂ production by PS II and O₂ uptake were observed using ¹⁸O₂ and mass spectrometry. PS II activity was higher in PTOX⁺ than in WT (Fig. 7). Addition of 25 μM of the PS II inhibitor 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea fully suppressed the electron transfer activity, showing the involvement of the PQ pool in both cases. Treatment by propyl gallate largely suppressed the difference in electron transfer activity observed between WT and PTOX⁺, showing that this difference was likely to be due to the activity of the oxidase. In these experiments, the PS II-mediated electron flow was balanced by a simultaneous increase in the O₂ uptake rate, thus supporting the view that, as in the case of *Chlamydomonas* PTOX, At-PTOX is a true quinol oxidase, using O₂ as an electron acceptor and releasing H₂O as a final product (24).

Measurement of a PS II-mediated Electron Flow to At-PTOX in Leaves—Similar fluorescence experiments were performed in stripped leaf discs treated with DBMIB, measuring chlorophyll fluorescence in order to probe PS II activity (Fig. 8). In the absence of inhibitor, similar electron flow rates were observed at low irradiances both in WT and transgenic leaf discs. In WT leaf discs, DBMIB strongly inhibited linear electron flow (90% inhibition at 75 μmol photons·m⁻²·s⁻¹), whereas in transgenic leaf discs inhibition by DBMIB was much less pronounced (60%

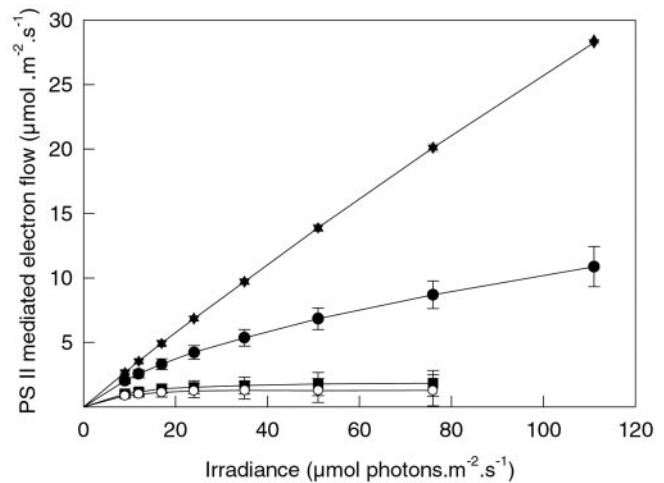


FIG. 8. Effect of DBMIB on PS II-mediated electron flow measured in stripped leaf discs from WT and PTOX⁺. ▲, WT control in water; ▼, PTOX⁺ control in water; ■, WT treated with 50 μM DBMIB; ●, PTOX⁺ treated with 50 μM DBMIB; ○, PTOX⁺ treated with 50 μM DBMIB and 1 mM propyl gallate. Note that because values for WT control and PTOX⁺ control are very close, corresponding symbols are superimposed. Results obtained for PTOX₁⁺ and PTOX₂⁺ were grouped, and error bars represent S.D. (six experiments).

inhibition at 75 μmol photons·m⁻²·s⁻¹). The DBMIB-insensitive electron flow observed in PTOX⁺ was inhibited by propyl gallate (Fig. 8) and reached basal rates measured in WT discs treated with propyl gallate. This experiment showed that in leaves placed under low light intensity, when linear electron flow to PS I was inhibited, a significant part of PS II-driven electron flow (about 35% of the maximal electron flow to PS I) can be directed toward PTOX and O₂.

Involvement of PTOX during Photosynthesis—We were then interested to determine whether the activity of At-PTOX, which can be evidenced either in the dark (Figs. 3 and 4) or in the light in the absence of functional electron transfer to PS I (Fig. 8), could be observed in the light during normal conditions of photosynthesis. During a dark to light induction of photosynthesis, typical variations in chlorophyll fluorescence were observed (37). Under low light intensity, these variations reflected changes in the electron transfer rate occurring during the activation of photosynthesis. The transient increase in fluorescence commonly observed in WT during the induction phase reflected the transient accumulation of plastoquinols due to the initial absence of PS I electron acceptors. In fact, an activation of the PS I acceptor side and of Calvin cycle enzymes was generally required to initiate CO₂ assimilation and further reoxidize NADPH. This transient was almost completely abolished in PTOX⁺ at the lowest irradiance (8 μmol photons·m⁻²·s⁻¹, Fig. 9A), indicating a highly efficient plastoquinol oxidation before the activation of PS I. After a few minutes of illumination, both *F_s* and *F_m* values were identical in WT and PTOX⁺. At this low irradiance, *F_m* was close to *F_s*, showing the absence of non-photochemical quenching. At higher light intensity (50 μmol photons·m⁻²·s⁻¹), a difference between WT and PTOX⁺ was also observed, *F_s* values remained lower in PTOX⁺ than in WT during the first 3 min of illumination (Fig. 9B). When illumination was prolonged, the decrease in *F_s* was more pronounced in WT, and after 10 min reached a lower level than in PTOX⁺. It should be noted that variations in *F_s* values were accompanied by concomitant changes in *F_m* (Fig. 9B). As a consequence, both non-photochemical (qN) and photochemical (qP) quenching parameters were lower in PTOX⁺ than in WT after 10 min of illumination. This effect on qN and qP was also observed at higher irradi-

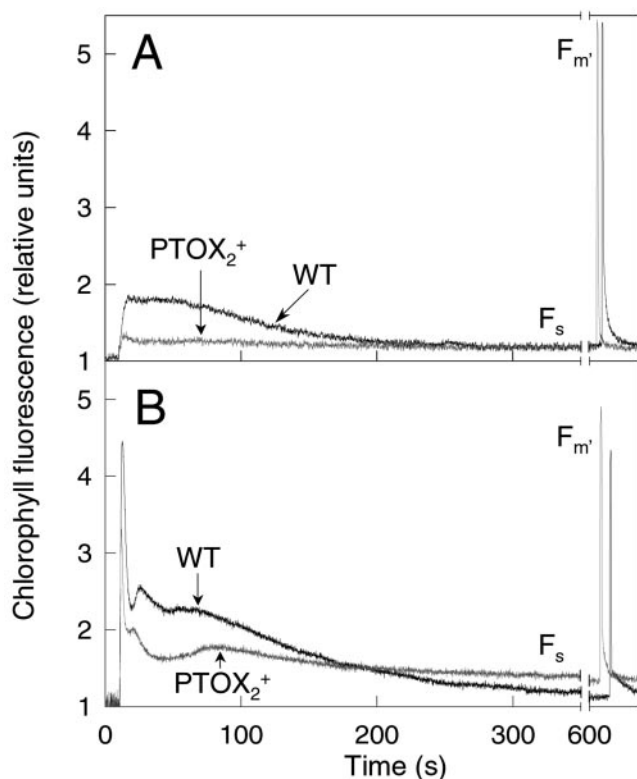


FIG. 9. Chlorophyll fluorescence induction curves measured during a dark to light transition on attached leaves of WT and PTOX₂⁺ tobacco plants. After 10 min a saturating pulse was used to determine $F_{m'}$ and to calculate both qP and qN values. A, at an irradiance of $8 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; qP and qN values were identical for WT and PTOX⁺; B, at an irradiance of $50 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Experimental chlorophyll fluorescence values have been normalized to the F_0 value. qP and qN values (0.956 and 0.212 in WT, respectively) were significantly decreased in PTOX⁺ (0.914 and 0.111, respectively).

ances (for example at $750 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Table I). However, at all irradiances, after 1 h of illumination when a steady state was reached, qN and qP of WT and PTOX⁺ became identical (Table I). Despite these fluctuations in fluorescence quenchings, no significant differences in PS II photochemical yields, measured either at 10 or 60 min, could be evidenced between WT and PTOX⁺ (Table I). Moreover, measurements of net CO₂ gas exchange at steady state showed no significant difference in quantum yield of CO₂ fixation in air as well as under non-photorespiratory conditions (Table II). In WT and PTOX⁺, rates of CO₂ fixation measured at saturating irradiance were also similar (Table II).

DISCUSSION

We have shown in this paper that when expressed in tobacco, At-PTOX is targeted to the chloroplasts and functions as a PQ oxidase. The activity of At-PTOX could be evidenced in intact leaves, following either photochemical or non-photochemical reduction of PQs and also in thylakoids, when PQs were reduced by exogenous NADH. Based on chlorophyll fluorescence and mass spectrometric measurements performed on thylakoids, we propose that At-PTOX drives PQ oxidation using molecular O₂ as a terminal electron acceptor. This agrees with previous conclusions reached from mass spectrometric measurements on *Chlamydomonas* mutants deficient in PS I (24). Because the Ndh complex is involved in the non-photochemical reduction of the PQ pool (8, 9, 34) (see Fig. 3C) and At-PTOX is involved in its non-photochemical oxidation, we conclude that a chlororespiratory electron transfer involving the plastid Ndh complex, the PQ pool, and At-PTOX occurs from NAD(P)H to

TABLE I
PS II photochemical yield, chlorophyll fluorescence quenching parameters (qN and qP) measured in WT and PTOX⁺ attached leaves
Measurements were performed 10 and 60 min after the onset of illumination ($750 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Values are means \pm S.D. of 3 experiments.

Chlorophyll fluorescence parameters	WT	PTOX ⁺
$(F_{m'} - F_s)/F_{m'}$	0.333 \pm 0.023	0.339 \pm 0.016
After 10 min illumination	qP 0.731 \pm 0.011	0.632 \pm 0.022
qN	0.670 \pm 0.018	0.593 \pm 0.022
$(F_{m'} - F_s)/F_{m'}$	0.350 \pm 0.026	0.324 \pm 0.032
After 60 min illumination	qP 0.743 \pm 0.018	0.759 \pm 0.009
qN	0.599 \pm 0.025	0.622 \pm 0.033

TABLE II
Quantum yield of CO₂ fixation (Φ_{CO_2}) and maximal rate of CO₂ assimilation measured in attached leaves of WT and PTOX tobacco
The maximal rate was measured under a saturating irradiance of $750 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Quantum yields were measured under photorespiratory conditions (air) and under non-photorespiratory conditions (O₂ 1.5% (v/v); CO₂ $750 \mu\text{l}\cdot\text{liter}^{-1}$). Number of experiments is indicated in parentheses.

	WT	PTOX ⁺
Φ_{CO_2} (air)	0.0481 \pm 0.0038 (3)	0.0440 \pm 0.0056 (3)
Φ_{CO_2} (1.5% O ₂ ; 750 $\mu\text{l}\cdot\text{liter}^{-1}$ CO ₂)	0.0783 \pm 0.0023 (3)	0.0801 \pm 0.0021 (3)
Maximal CO ₂ assimilation ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	13.7 \pm 0.7 (5)	13.6 \pm 1 (5)

O₂ in chloroplasts of transgenic tobacco expressing At-PTOX. In the dark, the redox status of PQs therefore depends on an equilibrium between its reduction by the Ndh complex and oxidation by PTOX.

In thylakoid membranes, PS I reaction centers and ATPase complexes are essentially located in stroma lamellae, whereas PS II are restricted to grana, cytochrome *b₆/f* complexes being found in both types of membranes. Like the Ndh complex (11, 38, 39), At-PTOX was found mainly in stroma lamellae, indicating that chlororespiration is restricted to stroma lamellae and is absent in granal thylakoids. Previously, the involvement of a propyl gallate-sensitive PQ oxidase in chlororespiration had been evidenced in *Chlamydomonas* cells (24). It was proposed that an At-PTOX homologue was functional in *Chlamydomonas* thylakoid membranes (24), but the corresponding gene has not yet been identified (16). In higher plants, first evidence for the existence of chlororespiration was based on the effect of respiratory inhibitors such as cyanide (40) or CO (41). Such effects cannot be explained by the inhibition of PTOX, because this protein was reported to be insensitive to these compounds (24, 25). This was confirmed in this study by the insensitivity to cyanide of the slow phase of the chlorophyll fluorescence decay. Therefore, the effects of respiratory inhibitors such as cyanide or CO more likely result from the inhibition of mitochondrial respiration that has been reported to affect the redox state of the PQ pool due to the existence of redox interactions between chloroplasts and mitochondria (16, 42). Such effects may alternatively reflect the existence of an alternative PQ oxidation pathway sensitive to cyanide and CO. In this respect, Fig. 7 indicates the existence in chloroplasts of a propyl gallate-insensitive mechanism for PQ oxidation. Recently, Casano *et al.* (6), studying a reconstituted system containing the Ndh complex and a plastidial hydroquinone peroxidase, proposed the existence of a PQ oxidation pathway using hydrogen peroxide as a terminal acceptor.

In addition to an involvement in dark reactions, we have

shown that At-PTOX may interact with photosynthetic electron transport reactions in illuminated leaves. In WT plants, a transient over-reduction of photosynthetic electron carriers occurs during the induction phase of photosynthesis. This is due to the fact that the photosynthetic carbon reduction cycle is not operative in the dark, because some of the enzymes of the cycle require light-induced activation by reduced thioredoxins (43). In transgenic tobacco plants expressing At-PTOX, the transient over-reduction of photosynthetic electron carriers is greatly decreased, indicating that electrons are diverted to O₂ via PTOX. This suggests that PTOX can potentially prevent over-reduction of PQs in the light. In plant mitochondria, alternative oxidase has been suggested to function as an "energy overflow," its activity being increased when the cytochrome pathway is saturated with electrons (44). Overexpression of alternative oxidase in this organelle has been shown to limit the generation of reactive oxygen species by preventing over-reduction of electron carriers (45). It should be noted, however, that expression of At-PTOX did not result in increased resistance of transgenic lines to photoinhibition (data not shown).

Differences in qN and qP values between WT and PTOX⁺ were transiently observed during the 10–30-min period of illumination, whereas the photochemical yield of PS II remained identical in both WT and PTOX⁺. The fact that both photochemical yield of PS II and rate of CO₂ fixation are identical suggests that at the end of the transitory induction period of photosynthesis, the oxidase function of PTOX does not contribute to drive significant electron flow compared with photosynthetic carbon reduction and oxidation cycles. On the other hand, lower qN and qP in PTOX⁺ between the initial induction period and steady state suggests that the pH gradient is lower and that PS II acceptors (Q_A) are more reduced compared with the WT. A lower pH gradient could indicate that cyclic electron reactions around PS I are down-regulated in PTOX⁺. Cyclic electron reactions around PS I have been reported to be controlled by the redox poise of some electron carriers; this effect was possibly mediated by molecular O₂ (46). Overexpression of PTOX, by modifying the redox poise of intersystem electron carriers, may perturb the establishment of cyclic electron transfer reactions. Interestingly enough, a role of chlororespiration in the control of cyclic electron flow around PS I was recently deduced from photoacoustic measurements performed in leaves under low O₂ concentration (12). The fact that chlororespiration and cyclic electron transfer reactions around PS I operate within the same membranes (stroma lamellae, see Ref. 16) further strengthens the hypothesis of a functional link between these two activities.

At steady state, qP and qN values were similar in WT and PTOX⁺, indicating that both the redox state of Q_A and the pH gradient reached similar levels. This may indicate that at steady state the contribution of cyclic electron flow around PS I is decreased compared with its high activity during the induction phase when terminal electron acceptors are not fully available. Alternatively, this effect might reflect the involvement of regulatory mechanisms that could be turned on under these conditions. For instance, the expression of some nuclear genes, like *cab* genes encoding light harvesting complex apoprotein, has been shown to be controlled by the redox state of PQs (47). The higher reduction of the PQ pool observed in PTOX⁺ during the induction of photosynthesis may trigger such long term adaptation processes and explain why similar pH gradients and Q_A redox state are finally reached at steady state in both types of plants. Analysis of gene expression in PTOX⁺ plants should inform us of the possible existence of such adaptive mechanisms.

If the role of At-PTOX in PQ oxidation could be demonstrated

in transgenic tobacco, the involvement of a functional PTOX in WT tobacco appears more difficult to establish. A faint band, specific to the native *ptox* transcripts, was amplified in WT tobacco by RT-PCR (Fig. 1A). However, by using an antibody raised against At-PTOX, no signal corresponding to native PTOX was detected in insoluble proteins prepared from WT tobacco leaves (Fig. 1). This may be due to the fact that either the antibody raised against the *Arabidopsis* enzyme does not cross-react with the tobacco enzyme or that the native enzyme is present in too small an amount to be detected. The latter hypothesis is the most probable, because this antibody cross-reacts with chromoplast preparations from pepper, another Solanaceae species (25), and also with chloroplast preparations from *C. reinhardtii* (24). In this respect, a doublet that may correspond to the native tobacco PTOX was detected in purified stroma lamellae preparations probed with the *Arabidopsis* antibody (data not shown). It should be noticed that the plastid Ndh complex, the other probable component of chlororespiration, has been reported to be present in leaves in very low amounts (4, 39). The slight effect of propyl gallate on the slow phase of the chlorophyll fluorescence decay measured in WT leaves (Fig. 3), may reflect a contribution of the native tobacco PTOX to the oxidation of PQs. In agreement with this interpretation, it has been reported recently (12) that in tobacco leaves the re-reduction rate of the oxidized primary electron donor in PS I (P₇₀₀⁺) is increased by propyl gallate. This effect was interpreted as the re-routing of electrons toward PS I when the putative tobacco plastid terminal oxidase is inhibited. Since PTOX most likely represents a minor component of thylakoid membranes, at least when plants are grown under normal conditions, a regulatory role (for instance in the control of cyclic electron flow) seems more probable than a direct bioenergetic role. However, more work remains to be done to determine clearly the involvement of native PTOX in leaves.

Different lines of evidence suggest that PTOX might become more abundant at particular developmental stages or under particular growth (or stress) conditions. In higher plant chloroplasts, the role of PTOX in carotenoid biosynthesis has been demonstrated from the analysis of *Arabidopsis* and tomato mutants (21, 22, 25). The variegated phenotype of the *Arabidopsis* mutant *immutans* was explained by an involvement of PTOX in phytoene desaturation, an important step in carotenoid biosynthesis occurring during the early stage of the greening process (21, 22). As suggested previously (16, 19), native PTOX might be more abundant in non-green plastid under conditions where the photosynthetic apparatus is not functional. High amounts of PTOX were reported in achlorophyllous membranes prepared from chromoplasts of red pepper fruits, where carotenoid biosynthesis is particularly active (25). Overexpression of At-PTOX did not influence the leaf carotenoid content, thus indicating that the PTOX level is not a limiting factor regulating carotenoid biosynthesis. Interestingly, the *IM* (or *PTOX*) promoter was shown to be active, and *IM* mRNAs were expressed ubiquitously in *Arabidopsis* tissues and organs throughout development, arguing in favor of a more global role for this protein in plastid metabolism (48).

In C₄ plants, subunits of the Ndh complex have been reported to be much more strongly expressed in bundle sheath chloroplasts than in mesophyll chloroplasts (49). In bundle sheath chloroplasts, only low levels of PS II are detected. In these cells, ATP required for CO₂ fixation is generated by cyclic electron transport around PS I. Interestingly, it was recently reported that bundle sheath cells from C₃ leaves have photosynthesis features close to those of C₄ leaves (50). It will be interesting to determine whether *ndh* and *ptox* genes are more strongly expressed in bundle sheath chloroplasts of C₃ plants

than in mesophyll cells and participate in the regulation of cyclic electron transfer reactions around PS I.

Acknowledgments—We thank Stéphan Cuiiné and Noëlle Bécuwe-Linka for technical assistance and Drs. Michel Havaux, Pascal Rey (CEA Cadarache, France), Doan Trung Luu (CNRS Montpellier, France), and Dominique Pontier (CNRS Grenoble, France) for helpful technical advice and stimulating discussion.

REFERENCES

- Scherer, S. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 458–462
- Bennoun, P. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 4352–4356
- Peltier, G., Ravenel, J., and Verméglio, A. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **893**, 83–90
- Sazanov, L. A., Burrows, P. A., and Nixon, P. J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1319–1324
- Cuello, J., Quiles, M. J., Albacete, M. E., and Sabater, B. (1995) *Plant Cell Physiol.* **36**, 265–271
- Casano, L. M., Zapata, J. M., Martin, M., and Sabater, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 942–948
- Guedeney, G., Corneille, S., Cuiiné, S., and Peltier, G. (1996) *FEBS Lett.* **378**, 277–280
- Burrows, P. A., Sazanov, L. A., Svab, Z., Maliga, P., and Nixon, P. J. (1998) *EMBO J.* **17**, 868–876
- Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K., and Yokota, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 9705–9709
- Joët, T., Cournac, L., Horvath, E. M., Medgyesy, P., and Peltier, G. (2001) *Plant Physiol.* **125**, 1919–1929
- Horvath, E. M., Peter, S. O., Joët, T., Rumeau, D., Cournac, L., Horvath, G. V., Kavanagh, T. A., Schafer, C., Peltier, G., and Medgyesy, P. (2000) *Plant Physiol.* **123**, 1337–1349
- Joët, T., Cournac, L., Peltier, G., and Havaux, M. (2002) *Plant Physiol.* **128**, 760–769
- Cleland, R. E., and Bendall, D. S. (1992) *Photosynth. Res.* **34**, 409–418
- Bendall, D. S., and Manasse, R. S. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1229**, 23–38
- Corneille, S., Cournac, L., Guedeney, G., Havaux, M., and Peltier, G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 59–69
- Peltier, G., and Cournac, L. (2002) *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 523–550
- Bennoun, P. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1186**, 59–66
- Hoefnagel, M. H. N., Atkin, O. K., and Wiskich, J. T. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 235–255
- Nixon, P. J. (2000) *Philos. Trans. R. Soc. Lond-Biol. Sci.* **355**, 1541–1547
- Cournac, L., Latouche, G., Cerovic, Z., Redding, K., Ravenel, J., and Peltier, G. (2002) *Plant Physiol.*, in press
- Wu, D. Y., Wright, D. A., Wetzler, C., Voytas, D. F., and Rodermel, S. (1999) *Plant Cell* **11**, 43–55
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G., and Kuntz, M. (1999) *Plant Cell* **11**, 57–68
- Carol, P., and Kuntz, M. (2001) *Trends Plant Sci.* **6**, 31–36
- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E. M., Kuntz, M., and Peltier, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17256–17262
- Josse, E. M., Simkin, A. J., Gaffe, J., Laboure, A. M., Kuntz, M., and Carol, P. (2000) *Plant Physiol.* **123**, 1427–1436
- Odell, J. T., Nagy, F., and Chua, N. H. (1985) *Nature* **313**, 810–812
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1985) *Science* **227**, 1229–1231
- Genty, B., Briañtais, J.-M., and Baker, N. R. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **990**, 87–92
- Rumeau, D., Cuiiné, S., Fina, L., Gault, N., Nicole, M., and Peltier, G. (1996) *Planta* **199**, 79–88
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 591–592
- Groom, Q. J., Kramer, D. M., Crofts, A. R., and Ort, D. R. (1993) *Photosynth. Res.* **36**, 205–215
- Harris, G. C., and Heber, U. (1993) *Plant Physiol.* **101**, 1169–1173
- Cournac, L., Guedeney, G., Joët, T., Rumeau, D., Latouche, G., Cerovic, Z., Redding, K., Horvath, E., Medgyesy, P., and Peltier, G. (1998) in *Photosynthesis: Mechanism and Effects* (Garab, G., ed) pp. 1877–1882, Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, The Netherlands
- Delosme, R. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **143**, 108–128
- Cournac, L., Josse, E. M., Joët, T., Rumeau, D., Redding, K., Kuntz, M., and Peltier, G. (2000) *Philos. Trans. R. Soc. Lond-Biol. Sci.* **355**, 1447–1453
- Kautsky, H., Appel, W., and Amann, H. (1960) *Biochem. Z.* **332**, 277–292
- Berger, S., Ellersiek, U., Westhoff, P., and Steinmuller, K. (1993) *Planta* **190**, 25–31
- Sazanov, L. A., Burrows, P., and Nixon, P. J. (1996) *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 739–743
- Garab, G., Lajko, F., Mustardy, L., and Marton, L. (1989) *Planta* **179**, 349–358
- Feild, T. S., Nedbal, L., and Ort, D. R. (1998) *Plant Physiol.* **116**, 1209–1218
- Bennoun, P. (1998) in *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J.-D., Goldschmidt-Clermont, M., and Merchant, S., eds) pp. 675–683, Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, The Netherlands
- Ruelland, E., and Miginiac-Maslow, M. (1999) *Trends Plant Sci.* **4**, 136–141
- Vanlerberghe, G. C., and McIntosh, L. (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 703–734
- Maxwell, D. P., Wang, Y., and McIntosh, L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8271–8276
- Ziem-Hanck, U., and Heber, U. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **591**, 266–274
- Escoubas, J. M., Lomas, M., LaRoche, J., and Falkowski, P. G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10237–10241
- Aluru, M. R., Bae, H., Wu, D. Y., and Rodermel, S. R. (2001) *Plant Physiol.* **127**, 67–77
- Kubicki, A., Funk, E., Westhoff, P., and Steinmuller, K. (1996) *Planta* **199**, 276–281
- Hibberd, J. M., and Quick, W. P. (2002) *Nature* **415**, 451–454
- Mills, W. R., and Joy, K. W. (1980) *Planta* **148**, 75–83

***In vitro* characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX)**

Eve-Marie Josse, Jean-Pierre Alcaraz, Anne-Marie Labouré and Marcel Kuntz

In vitro characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX)

Eve-Marie Josse, Jean-Pierre Alcaraz, Anne-Marie Labouré and Marcel Kuntz

Université J. Fourier and CNRS (Plastes et Différenciation Cellulaire, UMR 5575), Grenoble, France

The plastid terminal oxidase (PTOX) encoded by the *Arabidopsis* *IMMUTANS* gene was expressed in *Escherichia coli* cells and its quinone/oxygen oxidoreductase activity monitored in isolated bacterial membranes using NADH as an electron donor. Specificity for plastoquinone was observed. Neither ubiquinone, duroquinone, phyloquinone nor benzoquinone could substitute for plastoquinone in this assay. However, duroquinol (fully reduced chemically) was an accepted substrate. Iron is also required and cannot be substituted by Cu^{2+} , Zn^{2+} or Mn^{2+} . This plastoquinol oxidase activity is independent of temperature over the 15–40 °C range but increases with pH (from 5.5 to 9.0). Unlike higher plant mitochondrial alternative oxidases, to which PTOX shows sequence similarity (but also differences, especially in a putative quinone binding site and in cysteine

conservation), PTOX activity does not appear to be regulated by pyruvate or any other tested sugar, nor by AMP. Its activity decreases, however, with increasing salt (NaCl or KCl) concentration. Various quinone analogues were tested for their inhibitory activity on PTOX. Pyrogallol analogues were found to be inhibitors, especially octyl gallate ($I_{50} = 0.4 \mu\text{M}$) that appears far more potent than propyl gallate or gallic acid. Thus, octyl gallate is a useful inhibitor for future *in vivo* or *in organello* studies aimed at studying the roles of PTOX in chlororespiration and as a cofactor for carotenoid biosynthesis.

Keywords: alternative oxidase; immutans; iron center; plastoquinone; quinol oxidase.

The cloning of the *Arabidopsis* gene, *IMMUTANS*, has identified a new important plastid located enzyme [1,2]. Inactivation of this gene first indicated that it was a cofactor for early steps in carotenoid biosynthesis, namely phytoene desaturation. Reduced phytoene desaturation leads to reduced carotenoid content, which in turn leads to photo-oxidative damage visible as a variegated phenotype comprising white and green sectors in the *immutans* mutant. The tomato *ghost* mutant is impaired in the corresponding gene [3] and its phenotype resembles *immutans* in leaves while fruit do not redden and accumulate phytoene.

The *IMMUTANS* gene product shows limited similarity with mitochondrial alternative oxidases (AOX, [4]) that are ubiquinol oxidases catalyzing a cyanide-resistant reduction of oxygen to water in the respiratory electron transfer chain (recently reviewed in [5]). Sequence comparison between AOXs and the *IMMUTANS* gene product allowed a reassessment of the amino acids that are likely to have functional involvement in AOXs [6] and suggested that the *IMMUTANS* gene product may function as a terminal oxidase located within plastids (PTOX, [3]). These data are reinforced by the demonstration that electrons provided by photosystem II can be diverted at a significant rate towards a

chloroplast quinol oxidase in *Chlamydomonas* [7]. Based on the similarity of immunological and pharmacological properties between the *IMMUTANS* encoded PTOX in *Arabidopsis* and the plastoquinol oxidizing activity in *Chlamydomonas*, the involvement of PTOX in chlororespiration was proposed [7]. Furthermore, the *Arabidopsis* PTOX was functional when expressed in tobacco and strongly accelerated the nonphotochemical re-oxidation of quinones [8]. During the dark to light induction phases of photosynthesis at low irradiances, PTOX drives electron flow to O_2 .

The terminal oxidase activity of the *IMMUTANS* gene product could also be monitored after expression in *E. coli* [3]. Both *in vitro* and *in vivo* activity [8,9] are sensitive to nPG and to a lesser extent to SHAM. Both compounds are also known inhibitors of the mitochondrial AOX [10,11]. Thus, AOXs and PTOX share similar structural and catalytic features. However, a number of established characteristics of AOXs, such as regulatory mechanisms [12–15] and the use of iron as a cofactor [16–19], have not been assessed for PTOX. Thus, we set out to define, more fully, the properties of PTOX *in vitro*. In this report, we produced the protein in *E. coli* and studied its substrate preferences, the factors influencing its activity and the nature of suitable metal cofactors and inhibitors *in vitro*.

Materials and methods

Chemicals

The following chemicals were purchased from Sigma: 1,4-benzoquinone, duroquinone (2,3,5,6-tetramethyl-1,4-benzoquinone), decyl-ubiquinone (2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decyl-1,4-benzoquinone), vitamin K1 (2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone), decyl-plastoquinone (2,3-methyl-5-

Correspondence to M. Kuntz, Université J. Fourier, CERMO, BP53, 38041 Grenoble cedex 9, France.

Fax: + 33 4 76 51 43 36, Tel.: + 33 4 76 51 44 92,

E-mail: Marcel.Kuntz@ujf-grenoble.fr

Abbreviations: AOX, (mitochondrial) alternative oxidases; PTOX, plastid terminal oxidase; dPQ, decyl-plastoquinone; nPG, *n*-propyl gallate; DQ, duroquinone; VK1, vitamin K1; BQ, benzoquinone; dUQ, decyl-ubiquinone.

(Received 11 April 2003, revised 23 July 2003, accepted 25 July 2003)

decyl-1,4-benzoquinone), DBMIB (2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-1,4-benzoquinone, *n*-propyl gallate (3,4,5-trihydroxy-benzoic acid-*n*-propyl ester). The following chemicals were from Aldrich: pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene), octyl gallate (3,4,5-trihydroxybenzoic acid-*n*-octyl ester). The following chemicals were from Acros Organics: chloranilic acid (2,5-dichloro-3,6-dihydroxy-1,4-benzoquinone, *p*-chloranil (2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzoquinone), gallic acid (3,4,5-trihydroxy-benzoic acid).

Heterologous protein production

The portion of the *Arabidopsis IMMUTANS* cDNA coding for the entire mature peptide was in-frame inserted in the *E. coli* expression vector, pQE31 (Qiagen), as described [3].

E. coli cells (strain XL-1 Blue) were grown in M9/glycerol medium until $D_{600} = 0.3$. Isopropyl thio- β -D-galactoside was then added (final concentration 40 μ M) to induce expression of the recombinant gene during 3 h. The control strain was grown in parallel. After sonication and elimination of the debris, membranes were recovered upon centrifugation at 100 000 *g* for 1 h.

Measurement of oxygen consumption

Pelleted membranes were resuspended in 0.2 M Tris/HCl pH 7.5, 0.75 M sucrose. Oxygen consumption was measured in a Clark O₂ electrode chamber (Hansatech, Oxylab). A typical assay contained 100 μ g membrane protein in the following buffer: Tris-maleate 50 mM pH 7.5, 0.2 mM decyl-plastoquinone, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA. For experiments at pH 8.5–9.0, a 50 mM glycine/NaOH buffer was used. Unless otherwise stated, temperature was 25 °C. For experiments with different temperatures, the apparatus was recalibrated for each temperature. A typical O₂ trace is shown in [3,9]. Sets of data are compiled as histograms in the present study.

Immunodetection

Protein samples were fractionated by SDS/PAGE and electroblotted onto nitrocellulose. Immunodetection was performed using either the HRP-conjugate substrate kit (BioRad) or the ECL Western blotting kit (Amersham) as recommended by the suppliers. Production of polyclonal anti-PTOX was as described previously [9].

Results

Substrate requirement and factors influencing PTOX activity *in vitro*

Following expression of the *Arabidopsis IMMUTANS* cDNA in *E. coli*, bacterial membranes were isolated. NADH was used as an electron donor allowing the bacterial respiratory complex I to reduce quinones; this in turn drives O₂ consumption via either the cytochrome pathway (in the absence of KCN) or PTOX activity (in the presence of KCN).

As quinones are potentially rate-limiting, decyl-plastoquinone (dPQ) is a routinely present component of the reaction mix described by Josse *et al.* [3]. In fact, O₂

consumption could be detected without exogenously added quinones in both PTOX-containing membranes (Fig. 1A) and control membranes (from cells not expressing PTOX;

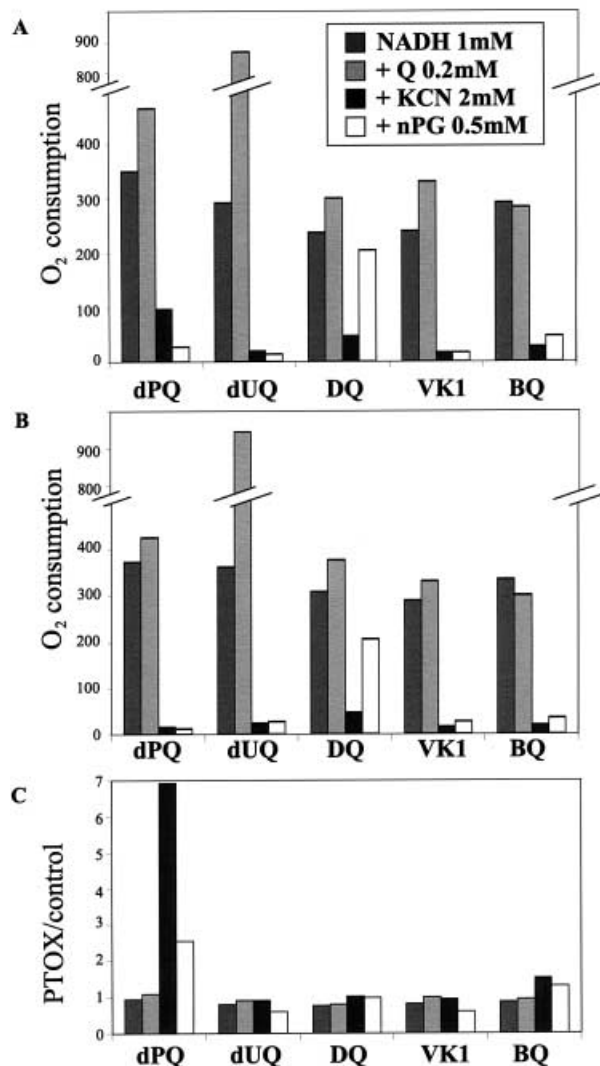


Fig. 1. Monitoring of *Arabidopsis* PTOX activity in isolated *E. coli* membranes in the presence of various added quinones. Electron transport was initiated by NADH addition (1 mM final concentration). Various quinones were then added (0.2 mM final concentration), namely decyl-plastoquinone (dPQ), or decyl-ubiquinone (dUQ), duroquinone (DQ), vitamin K1 (VK1) or benzoquinone (BQ). Sequential addition of KCN (inhibitor of the *E. coli* cytochrome *b*-dependent O₂ consumption; 2 mM final concentration) and then *n*-propyl gallate (nPG; inhibitor of PTOX-dependent O₂ consumption) followed. O₂ consumption was recorded and expressed as nmol O₂ min⁻¹ mg protein⁻¹. Aliquots of the same membrane samples were used for further experiments during a week: a progressive decline in overall respiratory activity was observed but experiments remained reproducible. Experiments were also reproducible from one sample preparation to another, although some variation in quantitative levels of respiratory activity was observed. Typical and representative experiments are summarized here: (A) experiment performed using membranes from a PTOX expressing strain; (B) experiment performed using membranes from a control strain; (C) Ratio of O₂ consumption in (A) over (B).

Fig. 1B). However, O₂ consumption was stimulated strongly in both membrane types (Fig. 1A,B) in the presence of 0.2 mM of ubiquinone and, to some extent, of dPQ, duroquinone or vitamin K1 (phylloquinone). In contrast, addition of benzoquinone did not lead to such changes (Fig. 1A,B): O₂ consumption rates were similar to controls without added quinones (not shown). This suggests that quinones are rate-limiting in this assay prior to KCN addition.

When KCN was added to PTOX-containing membranes, O₂ consumption rates decreased to background levels in the assays containing ubiquinone, vitamin K1 or benzoquinone (Fig. 1A), as they did without quinone addition (not shown). In contrast, an O₂ consumption rate attributed to PTOX activity was observed in the presence of dPQ. This activity, as we have demonstrated previously [3,7,9], can be identified by its specific inhibition by nPG. The fact that O₂ consumption is maintained above background level in the presence of duroquinone and KCN cannot be linked to PTOX, as nPG does not inhibit it. In the latter case, nPG stimulates O₂ consumption rate for a reason that is as yet unclear. This is also the case in control membranes (Fig. 1B). It shall be noted that, as expected, the cyanide-resistant O₂ consumption is not detected in these control membranes (Fig. 1B).

Figure 1C presents the ratio of O₂ consumption in PTOX-containing membranes relative to control membranes devoid of PTOX. This ratio is close to one for all tested quinones except dPQ. In this latter case, the ratio rises only after KCN addition, which is consistent with our previous observation [3] that PTOX activity is only engaged in this assay when the cytochrome pathway is blocked. It should also be mentioned that, when quinones were added after KCN, only the addition of dPQ, not the other quinones, allowed a restoration of O₂ consumption by the PTOX-containing membrane (not shown). All these data indicate that the activity of PTOX is dependent on the presence of dPQ in this assay.

However, because of the above mentioned difficulty encountered using duroquinone, it was necessary to examine whether duroquinol added directly as an electron donor can be a substrate for PTOX. In a modified assay (NADH and dPQ being omitted), a cyanide-resistant O₂ consumption was observed (not shown) upon addition of fully reduced duroquinol (*in vitro* borohydride-reduced duroquinone; final concentration 0.2 mM). This activity was totally inhibited by nPG. This activity was absent in control membranes.

In all subsequent assays (using NADH as an electron donor), dPQ was routinely added. A potential pH dependence of PTOX activity was first examined. As shown in Fig. 2A, prior to KCN addition, the highest oxygen consumption rate was observed at pH 6.0 and 6.5, with a decline at higher pH especially at pH 9.0. In contrast, after KCN addition the O₂ consumption rate attributed to PTOX increased progressively in the tested pH range. This increase, visible in Fig. 2A, might be underestimated due to the lower respiratory activity of *E. coli* membranes at the highest pH. One can also note that, after nPG addition, a certain increase in O₂ consumption occurs at the highest pH. However, this is a nonspecific effect also observed in control membranes (Fig. 2B). This prevents us from calculating the

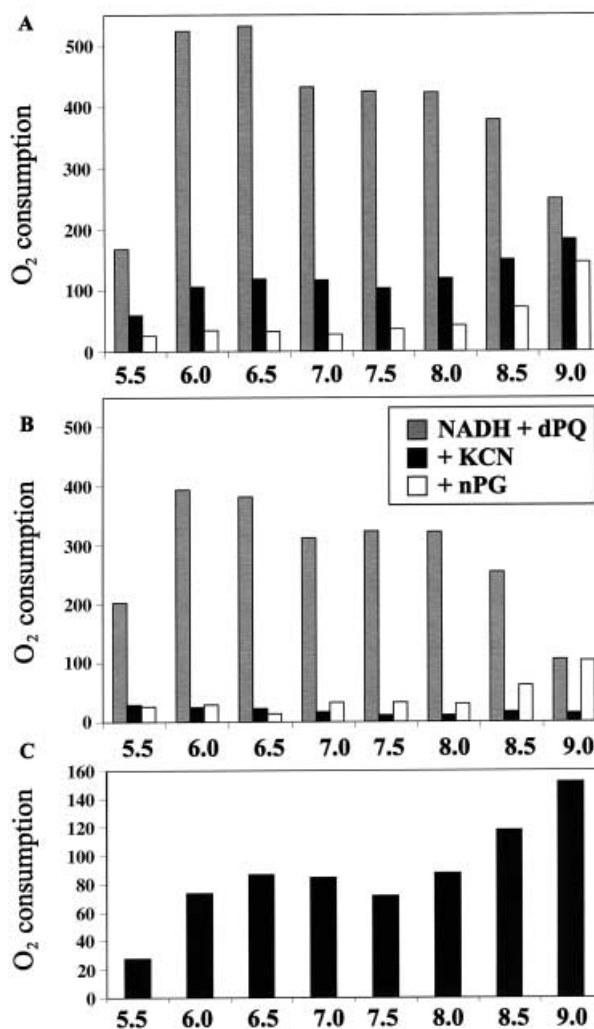


Fig. 2. pH influence on PTOX activity. Experiments were performed as in Fig. 1, except that dPQ was added in all cases together with NADH. (A) Experiment performed using membranes from a PTOX-expressing strain. (B) Experiment performed using membranes from a control strain. (C) PTOX activity calculated as O₂ consumption in presence of KCN minus averaged O₂ consumption in presence of nPG (see text).

real PTOX activity (O₂ consumption rate after KCN addition minus rate after nPG addition). In order to circumvent this problem, Fig. 2C presents PTOX activities recalculated from each value obtained after KCN addition minus the averaged values after nPG addition (excluding those at the highest pH).

We then examined the effect of temperature on PTOX activity (Fig. 3). As expected for respiratory activity of *E. coli* membranes, prior to KCN addition, an increase in O₂ consumption (of approximately fourfold) was observed with a temperature rise from 15 to 40 °C. A positive effect of temperature rise was also observed after KCN addition. This is, however, probably the consequence of the increase in the overall quinone reducing activity of the membranes and not a direct effect on PTOX activity. This is corroborated by the fact that the ratio of O₂ consumption before and

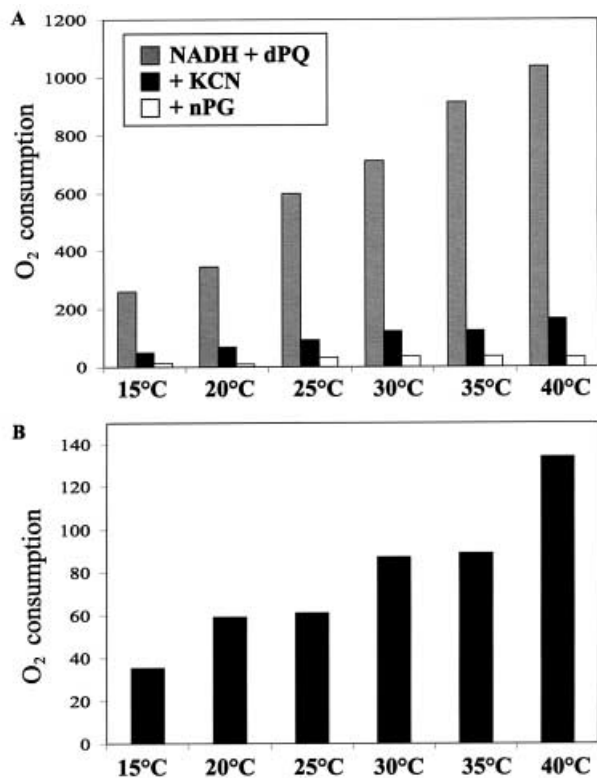


Fig. 3. Temperature influence on PTOX activity. Experiments were performed as in Fig. 2, except that the pH was 7.5. (A) Experiment performed using membranes from a PTOX-expressing strain. (B) PTOX activity calculated as O₂ consumption in presence of KCN minus O₂ consumption in presence of nPG.

after KCN addition does not change significantly with temperature (not shown). It is also noticeable that PTOX activity (calculated as the rate after KCN minus rate after nPG) increases approximately fourfold with temperature from 15 to 40 °C, in a reasonably linear manner up to 40 °C. This indicates that PTOX is active over a wide temperature range and suggests PTOX could help protecting plants against temperature stress. However, temperatures below 15 °C could not be tested, as respiratory activity of *E. coli* membrane is too low under those conditions.

PTOX exhibits differences with the mitochondrial alternative oxidase

Despite the presence of conserved amino acids [3,4,19], AOX and PTOX sequence alignments also show striking differences, for example in between two highly conserved regions that are probably involved in iron binding ([6], Fig. 4). Interestingly, this region matches a consensus sequence [aliphatic-(X)3-H-(X)2/3-L/T/S] proposed by Fisher and Rich [20] for quinone binding sites. Although speculative at this stage, this consensus sequence was found in various quinone-binding proteins including AOX [20,21]. It should be mentioned that we position this potential site in a different polypeptide region than originally proposed in AOX [20], the reason being that the originally proposed region is not a highly conserved one in PTOX sequences. Furthermore, a quinone binding site would be expected to be close to iron binding amino acids, which is the case here ([6], Fig. 4). This potential quinone-binding site appears to be conserved in PTOX sequences (including a homologous sequence from the cyanobacterium *Nostoc*) on one hand and in numerous AOX sequences on the other. Thus, the

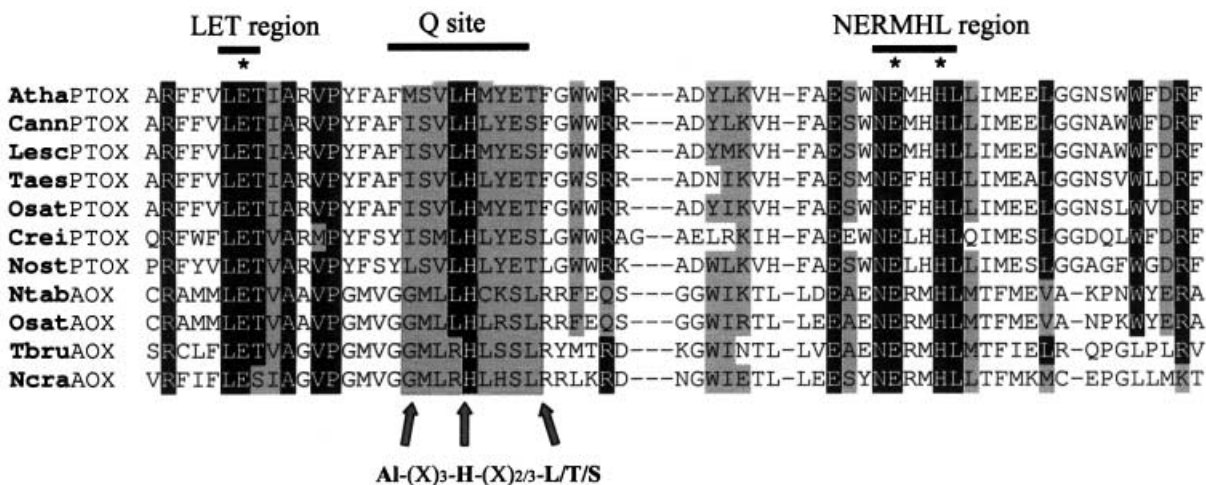


Fig. 4. Comparison of a putative quinone-binding site in PTOX and AOX sequences. The potential Q site is shaded and arrows indicate the conserved residues matching a consensus sequence proposed by Fisher and Rich [20]. Neighbouring amino acids probably involved in iron binding are shown (*) in a conserved LET and NERMHL region [6]. Highly conserved positions are boxed in black (identical amino acids) or grey (similar amino acids). Sequences used: AthaPTOX: *Arabidopsis thaliana* (accession number CAA06190, position 130–195); CannPTOX: *Capsicum annuum* (AAG02288, 132–197); LescPTOX: *Lycopersicon esculentum* (AAG02286, 141–206); TaesPTOX: *Triticum aestivum* (AAG0045, 52–117); OsatPTOX: *Oryza sativa* (AF085174, 116–181); CreiPTOX: *Chlamydomonas reinhardtii* (AAM12876, 272–388); NostPTOX: *Nostoc* sp. PCC 7120 (NP-486136, 23–88); NtabAOX: *Nicotiana tabacum* (Q41224, 176–240); OsatAOX: *O. sativa* (BAA28772, 155–219); TbruAOX: *Trypanosoma brucei* (BAB72245, 117–181); NcraAOX: *Neurospora crassa* (EAA29895, 157–221).

sequences of this site are grouped into separate classes for PTOX and AOX.

Another striking sequence difference is the lack of conserved Cys in the N-terminal domain of PTOX [3] whilst a conserved Cys in AOX is involved in the stimulation of AOX activity by α -keto acids [13,14,22]. When examining the effect of pyruvate on PTOX activity, no detectable effect was observed when pyruvate was added to the reaction mixture in the range of 1–8 mM (data not shown). It should also be mentioned that other carbohydrates, namely glyceraldehyde-3-phosphate or 3-phospho-glycerate (that play a more central role in plastid metabolism) had no effect either (data not shown).

As some fungal AOX, not stimulated by pyruvate, are induced by purine nucleotides, such an activation mechanism was examined for PTOX. However, addition of AMP had no effect on PTOX activity (data not shown).

Millenaar *et al.* [23] reported on the *in vivo* inhibitory effect of sugars and organic acids (citrate) on the mitochondrial AOX activity and proposed that the effect of organic acids could be due to the fact that they chelate metal cations. We did observe an inhibitory effect of both citrate and malate on PTOX activity *in vitro*. However, a similar inhibitory effect was also observed upon addition of NaCl at a concentration identical to its presence in the malate and citrate solutions (Table 1). It is therefore probable that, in our assay, inhibition of PTOX activity in the presence of these organic acids is due to the increasing salt concentration (possibly affecting membrane association of PTOX), rather than to a metal chelating activity. This is confirmed by the fact that KCl also showed an inhibitory effect on PTOX activity to a similar extent as NaCl (not shown). Therefore, KCl (which was routinely present in the reaction mixture) should be omitted for optimized PTOX activity.

Iron requirement for PTOX activity

To examine the role of iron and other metals, PTOX expressing bacteria and control bacteria were grown in the

presence of 50 μ M *o*-phenanthroline, a chelator of divalent cations [18], which was added at the time PTOX expression was induced. This led to a slow-down in bacterial growth. However, as shown in Fig. 5A, this treatment had no influence on O₂ consumption of membranes isolated subsequently from control cells. However, it dramatically abolished PTOX activity in PTOX-expressing cells. In contrast, when FeSO₄ (125 μ M) was added to the medium together with *o*-phenanthroline, PTOX activity was observed. CuSO₄, MnSO₄ or ZnSO₄ addition could not restore PTOX activity (not shown).

A complementary experiment was performed by adding iron at the end of the culture phase of *o*-phenanthroline-treated bacteria, after washing away the chelator by

Table 1. Effect of citrate, malate and NaCl on PTOX activity *in vitro*.

Assays were performed in the presence of NADH, decyl-plastoquinone and KCN as described in the figure legends. Citrate or malate was added to PTOX-containing membranes to the given concentrations from a 0.1 M stock-solution (buffered by the addition of NaOH to a 0.2 M final concentration). The concentration of NaCl was also increased in a separate assay. PTOX activity is given as percentage of starting O₂ consumption (before addition of these compounds). The latter activity (approximately 65 nmol·min⁻¹·mg protein⁻¹) was calculated from the O₂ consumption in the presence of KCN minus residual O₂ consumption after *n*-propyl gallate addition.

[Cit] or [mal] (mM)	PTOX activity (%) in presence of:			
	Cit	Mal	NaCl	[NaCl] (mM)
0	100	100	100	0
1	89	95	80	2
5	77	83	77	10
10	61	73	70	20

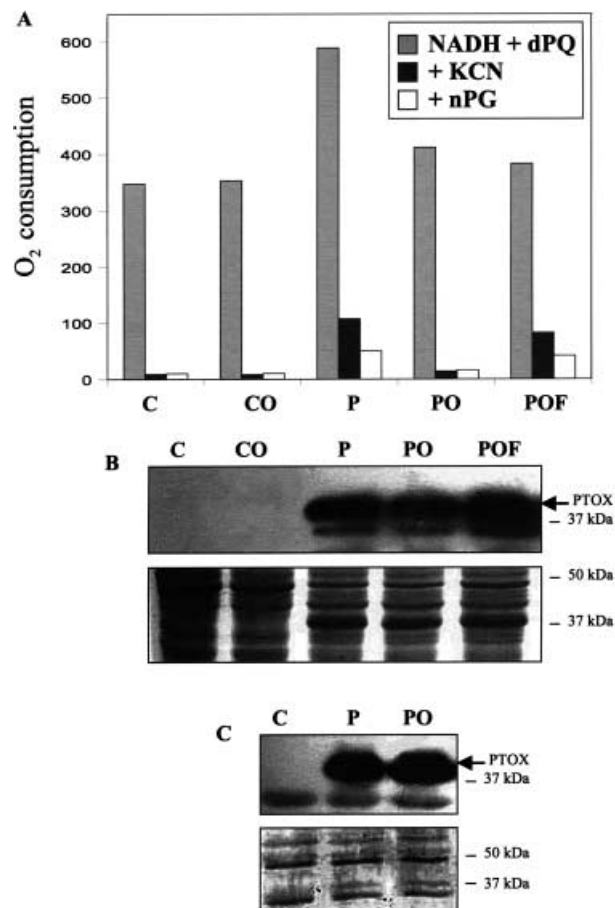


Fig. 5. Influence of metal cations on PTOX activity and integration in *E. coli* membranes. (A) Monitoring of PTOX activity using assays performed as described in Fig. 2. Membrane samples were from the following bacterial cultures: C, untreated control; CO, treated with 50 μ M *o*-phenanthroline; P, untreated PTOX-expressing; PO, expressing PTOX and treated with *o*-phenanthroline; POF, expressing PTOX and treated with both *o*-phenanthroline and 125 μ M FeSO₄. (B) The upper panel shows the immunodetection of PTOX (arrow) using polyclonal antibodies [3,9] on blots of 50 μ g protein samples extracted from the bacterial cultures mentioned in (A) and separated by PAGE. Lower panel shows a Coomassie staining of the gel. (C) As in (B), using 20 μ g protein samples from purified membranes. The strong immunodetected band below PTOX corresponds to an abundant protein visible by Ponceau staining in all lanes of the gel (lower panel).

centrifugation and resuspension of the bacteria. In this case, PTOX activity could be partially restored (not shown). We failed to obtain such a re-activation when FeSO₄ was added directly to isolated membranes.

Protein gel blots were probed with an anti-PTOX Ig to examine whether PTOX was actually present after treatment. As shown in Fig. 5B, while PTOX was not detected in control cells, it is detected in similar amounts in nontreated, *o*-phenanthroline-treated and *o*-phenanthroline plus FeSO₄-treated PTOX expressing cells. Figure 5C shows that PTOX is present in similar amounts in the membrane fraction isolated from PTOX-containing cells whether iron has been chelated or not. Thus, iron deprivation does not seem to prevent membrane association of PTOX.

Inhibitors of PTOX activity *in vitro*

It is worth mentioning that when halogenated quinone analogues were tested, namely dibromo-methyl-isopropyl-benzoquinone (DBMIB), chloranilic acid or *p*-chloranil, no inhibitory effect on PTOX could be demonstrated (not shown).

We then examined the effect of *n*-propyl-gallate (nPG) analogues (Fig. 6). We first checked the noncarboxylic derivative, pyrogallol and found it had no effect on PTOX activity up to 1 mM, with only a slight inhibition evident at 2 mM (not shown). We then checked gallic acid, the nonesterified derivative of nPG. This compound had no effect on the O₂ consumption rate of control membranes when added in the range of 0.1–2 mM. In contrast, a concentration-dependent inhibition was observed on PTOX activity (Fig. 7A). An inhibition of approximately 50% was observed at 0.9 mM, which is a ninefold higher concentration than for nPG [9]. In contrast, when *n*-octyl-gallate, a gallic acid derivative esterified with a long-chain acyl group, was used, a clear inhibition of PTOX activity was observed (100% at 5 μM). An inhibition of approximately 50% was observed at 0.4 μM, which is a 250-fold lower concentration than for nPG (Figs 6,7).

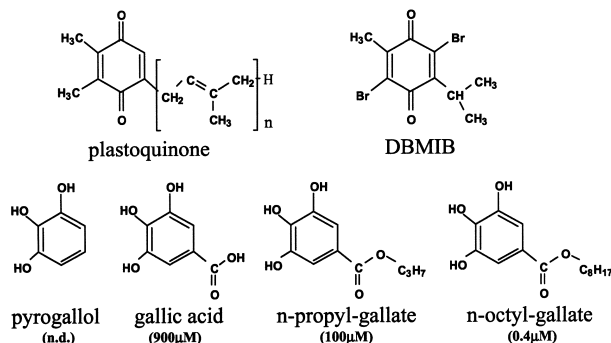


Fig. 6. Chemical structures of plastoquinone compared to quinone analogues. Inhibitor concentration leading to 50% inhibition of PTOX activity are given in brackets, except for pyrogallol for which this value could not be determined (n.d.). DBMIB, which does not inhibit PTOX activity, is shown for comparison.

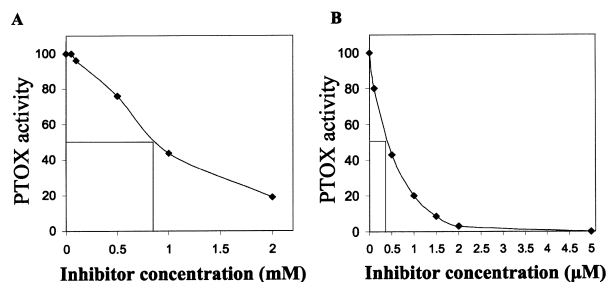


Fig. 7. Sensitivity of PTOX activity to gallic acid (A) or *n*-octyl gallate (B). Experiments were performed as described in Fig. 2, except that *n*-propyl gallate was substituted by increasing concentration of the given inhibitors. Activity before addition of inhibitor is set at 100 (absolute amount were calculated as explained in Table 1).

Discussion

The *in vivo* functions of PTOX are obviously complex as they are linked to both carotenoid biosynthesis and chlororespiration [4]. To obtain further knowledge of this enzyme, we have used an *in vitro* assay based on *E. coli* membranes which have incorporated PTOX and which uses NADH as an electron donor. In this assay, we observed a specificity for plastoquinone for PTOX activity (plastoquinol oxidase). The ability of PTOX to use plastoquinol as a substrate was not unexpected as it is the major quinone in plastids. However, the fact that reduced quinones, such as vitamin K1, are not used by PTOX was not an obvious feature, as it is also found in plastids. The inability of PTOX to use ubiquinol in our *E. coli* membrane-based assay is also unexpected as it is the homologous quinone in this electron transfer chain and, out of all tested quinones, it is the one which most efficiently incorporated into it (judging from its strong stimulation of respiratory rates; Fig. 1). It is therefore unlikely that the inability of PTOX to use ubiquinol is an artefact of this assay (which relies on the ability of the membranes to reduce quinones). Therefore, we propose that the preference of PTOX for plastoquinol over ubiquinol may be linked to a steric compatibility/incompatibility of these quinones with the PTOX quinone-binding site. This suggestion needs to be tested experimentally.

It should be noted (Fig. 1) that benzoquinone was the only quinone tested that did not stimulate O₂ consumption in *E. coli* membranes (prior to KCN addition). Thus, benzoquinone is not likely to be integrated in this electron transport chain. Whether a benzoquinone derivative with an allylic/terpenic side chain would be functional and possibly a substrate for PTOX remains to be tested.

We also observed that addition of duroquinone could not substitute for plastoquinone in the NADH-based assay. However, duroquinol (when added in its fully reduced form) can serve as an electron donor to PTOX. In the former case, duroquinone is incorporated into the electron transfer chain (judging from its stimulatory effect on *E. coli* membrane respiration; Fig. 1), but it is certainly not present in a fully reduced form. It is not currently known whether the apparent discrepancy between these assays is due to a strong preference of PTOX for plastoquinol over duroquinol, or to a lower concentration of duroquinol in the NADH-based assay.

Nevertheless, our data describe two useful assays for monitoring PTOX activity, namely a simple one (in which all added components, namely plastoquinone and NADH, are commercially available), and one in which the concentration of the (artificial, *in vitro* reduced) electron donor can be changed in a controlled way.

Comparison of sequences of both PTOX and AOX identifies a putative quinone-binding site (Fig. 4) that clearly differs between PTOX and AOX. The consensus sequence is aliphatic-SVL-H-M/L-YE-T/S for PTOX and GML-L/R-H-L/C-XSL for AOX. This might explain their different substrate preferences. A fuller understanding of quinone–protein interactions in this class of enzyme may be achieved by testing the effect of sequence modification on substrate specificity.

The influence of temperature (Fig. 3) or pH increase (Fig. 2) on PTOX activity observed in this report can only presently be considered as valid for the present assay. As it has been shown that PTOX, when over-expressed in tobacco, can accelerate quinol re-oxidation in photosynthetic membranes [8], it will be interesting to examine whether pH also regulates its activity *in planta*. It is known that stromal alkalization does occur in light and allows optimal functioning of photosynthetic carbon reduction cycle enzymes [24–26]. It should also be mentioned that Mg-protoporphyrin-IX monomethylester cyclase (a di-iron enzyme) activity also has a pH value optimum of ≈ 9.0 [27]. Although it is difficult to know precisely what the pH values are in the microenvironment of the stromal side of thylakoids, reported stromal pH changes are in the same range as that which increases PTOX enzyme activity *in vitro*. Also, the amount of PTOX enzyme increases during light periods and decreases during dark periods [28].

Our observation (Table 1) that increasing salt concentrations inhibits PTOX activity in the present assay was unexpected in the light of the opposite effect of salt on AOX activity [29]. It will be necessary to examine the effect of salt on PTOX in homologous plastid membranes.

Sequence comparison between PTOX and AOX [3,4] revealed that PTOX does not possess the conserved Cys present in the N-terminal domain of higher plant AOXs which is involved in the activation of its enzyme activity by pyruvate [12–14]. A number of other conserved Cys in PTOX [3,4] could potentially substitute for the one which is active in AOX. However, our present data suggest that such an activation mechanism does not operate for PTOX. This is also the case for AOX from lower eukaryotes [30] which are all lacking this conserved Cys.

Our data show that PTOX activity is dependent on iron, which cannot be substituted by other divalent cation metals (Fig. 5). That AOX is a di-iron carboxylate protein has been demonstrated recently by EPR studies [17]. Therefore, it seems reasonable to conclude that the proposed iron binding sites in PTOX sequences [3,6,19] are part of a di-iron carboxylate centre.

The available PTOX null mutants (*immutans*, *ghost*), as well as over-expression lines, are useful tools to check for *in vivo* roles of PTOX [1–3,8]. However, specific and potent inhibitors are also of interest as they would allow inactivation of PTOX at a certain time during plant development without pleiotropic effects that can be

associated with genetic mutants. When examining potential inhibitors, we observed that none of the tested quinone-like structures with substitutions on all carbons of the ring (e.g. DBMIB; Fig. 6) inhibited PTOX activity. In contrast, pyrogallol derivatives (that all possess unsubstituted carbons) all showed inhibitory activity. This suggests that it is the core of the quinone-like structures (the pyrogallol or gallic acid moiety) that is actually inhibiting PTOX activity (provided this core structure is sterically compatible with the quinone binding site). However, gallic acid itself is poorly inhibitory (Fig. 7) without a nonpolar side chain. The latter may favour positioning of the gallic acid moiety in a hydrophobic environment. In this respect, PTOX does not seem to differ from AOX [11,31]. This information can be used to design new specific inhibitors. Gallic acid analogues, with even longer hydrophobic side chains, and possibly with another group substituting for an alcohol group, are potential candidates. Currently, octyl gallate, which is a far better inhibitor than nPG, can conveniently replace nPG for *in organello* or *in vivo* studies.

Acknowledgements

We thank Drs P. Carol, A.J. Dorne, J. Gaffé and I. Prieur-Lavoué for helpful discussions, E. Charpentier and L. Zekraoui for technical assistance.

References

1. Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G. & Kuntz, M. (1999) Mutations in the *Arabidopsis* gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* **11**, 57–68.
2. 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. *Plant Cell* **11**, 43–55.
3. Josse, E.M., Simkin, A.J., Gaffé, J., Labouré, A.M., Kuntz, M. & Carol, P. (2000) A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol.* **123**, 1427–1436.
4. Carol, P. & Kuntz, M. (2001) A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci.* **6**, 31–36.
5. Moore, A.L., Albury, M.S., Crichton, P.G. & Affourtit, C. (2002) Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends Plant Sci.* **7**, 478–481.
6. Berthold, D.A., Andersson, M.E. & Nordlund, P. (2000) New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 241–254.
7. Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E.M., Kuntz, M. & Peltier, G. (2000) Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J. Biol. Chem.* **275**, 17256–17262.
8. Joët, T., Genty, B., Josse, E.M., Kuntz, M., Cournac, L. & Peltier, G. (2002) Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco. *J. Biol. Chem.* **277**, 31623–31630.
9. Cournac, L., Josse, E.M., Joët, T., Rumeau, D., Redding, K., Kuntz, M. & Peltier, G. (2000) Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in

- chlororespiration. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**, 1447–1454.
10. Siedow, J.N. & Girvin, M.E. (1980) Alternative respiratory pathway: its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. *Plant Physiol.* **65**, 669–674.
 11. Siedow, J.N. & Bickett, D.M. (1981) Structural features required for inhibition of cyanide-insensitive electron transfer by propyl gallate. *Arch. Biochem. Biophys.* **207**, 32–39.
 12. Millenaar, F.F., Benschop, J.J., Wagner, A.M. & Lambers, H. (1998) The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* **118**, 599–607.
 13. Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Sweet, C.R., Lennon, A.M., Rauch, G.S. & Siedow, J.N. (1998) Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* **273**, 30750–30756.
 14. Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L. & Yip, J.Y. (1998) Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell* **10**, 1551–1560.
 15. Affourtit, C., Albury, M.S., Crichton, P.G. & Moore, A.L. (2002) Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett.* **510**, 121–126.
 16. Siedow, J.N., Umbach, A.L. & Moore, A.L. (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear center. *FEBS Lett.* **362**, 10–14.
 17. Berthold, D.A., Voevodskaya, N., Stenmark, P., Graslund, A. & Nordlund, P. (2002) EPR studies of the mitochondrial alternative oxidase. Evidence for a diiron carboxylate center. *J. Biol. Chem.* **277**, 43608–43614.
 18. Ajayi, W.U., Chaudhuri, M. & Hill, G.C. (2002) Site-directed mutagenesis reveals the essentiality of the conserved residues in the putative diiron active site of the trypanosome alternative oxidase. *J. Biol. Chem.* **277**, 8187–8193.
 19. Berthold, D.A. & Stenmark, P. (2003) Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 497–517.
 20. Fisher, N. & Rich, P.R. (2000) A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J. Mol. Biol.* **296**, 1153–1162.
 21. Dupuis, A., Prieur, I. & Lunardi, J. (2001) Towards a characterization of the connecting module of Complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 159–168.
 22. Umbach, A.L., Gonzalez-Meler, M.A., Sweet, C.R. & Siedow, J.N. (2002) Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1554**, 118–128.
 23. Millenaar, F.F., Gonzalez-Meler, M.A., Siedow, J.N., Wagner, A.M. & Lambers, H. (2002) Role of sugars and organic acids in regulating the concentration and activity of the alternative oxidase in *Poa annua* roots. *J. Exp. Bot.* **53**, 1081–1088.
 24. Werdan, K., Heldt, H.W. & Milovancev, M. (1975) The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO₂ fixation in the light and dark. *Biochim. Biophys. Acta* **396**, 276–292.
 25. Wu, W. & Berkowitz, G.A. (1992) Stromal pH and photosynthesis are affected by electroneutral K⁺ and H⁺ exchange through chloroplast envelope ion channels. *Plant Physiol.* **98**, 666–672.
 26. Hauser, M., Eichelmann, H., Oja, V., Heber, U. & Laisk, A. (1995) Stimulation by light of rapid pH regulation in the chloroplast stroma *in vivo* as indicated by CO₂ solubilization in leaves. *Plant Physiol.* **108**, 1059–1066.
 27. Walker, C.J., Castelfranco, P.A. & Whyte, B.J. (1991) Enzymological properties of the Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester oxidative cyclase system. *Biochem. J.* **276**, 691–697.
 28. Simkin, A.J., Labouré, A.M., Kuntz, M. & Sandmann, G. (2003) Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. *Z. Naturforsch.* **58c**, 371–380.
 29. Kay, C. & Palmer, J.M. (1985) Solubilization of the alternative oxidase of cuckoo-pint (*Arum maculatum*) mitochondria. Stimulation by high concentration of ions and effects of specific inhibitors. *Biochem. J.* **228**, 309–318.
 30. Umbach, A.L. & Siedow, J.N. (2000) The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 234–245.
 31. Hoefnagel, M.H., Wiskich, J.T., Madgwick, S.A., Patterson, Z., Ottmeier, W. & Rich, P.R. (1995) New inhibitors of the ubiquinol oxidase of higher plant mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **233**, 531–537.

**Deletion of the tobacco plastid *psbA* gene
triggers an upregulation of the thylakoid-
associated NAD(P)H dehydrogenase
complex and the plastid terminal oxidase
(PTOX)**

Elena Baena-González, Yagut Allahverdiyeva, Zora Svab, Pal Maliga,
Eve-Marie Josse, Marcel Kuntz, Pirkko Mäenpää and Eva-Mari Aro

Deletion of the tobacco plastid *psbA* gene triggers an upregulation of the thylakoid-associated NAD(P)H dehydrogenase complex and the plastid terminal oxidase (PTOX)

Elena Baena-González^{1,†}, Yagut Allahverdiyeva¹, Zora Svab², Pal Maliga², Eve-Marie Josse³, Marcel Kuntz³, Pirkko Mäenpää¹ and Eva-Mari Aro^{1,*}

¹Department of Biology, Plant Physiology and Molecular Biology, University of Turku, FIN-20014 Turku, Finland,

²Waksman Institute, Rutgers University, 190 Frelinghuysen Road, Piscataway, NJ 08854, USA, and

³Laboratoire de Génétique Moléculaire des Plantes, CNRS-Université Joseph Fourier, UMR 5575, BP 53X, 38041 Grenoble Cedex 09, France

Received 12 March 2003; revised 30 May 2003; accepted 13 June 2003.

*For correspondence (fax +358 2 333 5549; e-mail evaaro@utu.fi).

†Present address: Department of Molecular Biology, Wellman 11, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114, USA.

Summary

We have constructed a tobacco *psbA* gene deletion mutant that is devoid of photosystem II (PSII) complex. Analysis of thylakoid membranes revealed comparable amounts, on a chlorophyll basis, of photosystem I (PSI), the cytochrome *b6f* complex and the PSII light-harvesting complex (LHCII) antenna proteins in wild-type (WT) and $\Delta psbA$ leaves. Lack of PSII in the mutant, however, resulted in over 10-fold higher relative amounts of the thylakoid-associated plastid terminal oxidase (PTOX) and the NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex. Increased amounts of Ndh polypeptides were accompanied with a more than fourfold enhancement of NDH activity in the mutant thylakoids, as revealed by in-gel NADH dehydrogenase measurements. NADH also had a specific stimulating effect on P700⁺ re-reduction in the $\Delta psbA$ thylakoids. Altogether, our results suggest that enhancement of electron flow via the NDH complex and possibly other alternative electron transport routes partly compensates for the loss of PSII function in the $\Delta psbA$ mutant. As mRNA levels were comparable in WT and $\Delta psbA$ plants, upregulation of the alternative electron transport pathways (NDH complex and PTOX) occurs apparently by translational or post-translational mechanisms.

Keywords: chloroplast electron transfer, D1 protein, photosystem II, plastome transformation.

Introduction

In oxygen-evolving organisms, the reaction center of photosystem II (PSII) consists of the D1 protein, the D2 protein, cytochrome *b₅₅₉*, and additional small proteins (Nanba and Satoh, 1987). The entire PSII complex, consisting of around 25 subunits, acts as a light-driven water-plastoquinone oxidoreductase and, together with cytochrome *bf* complex, photosystem I (PSI), and the ATP synthase, is responsible for production of NADPH and ATP (for a review, see Barber, 1998). As a crucial component of the chloroplast redox chemistry, PSII contributes to the regulation of soluble enzyme activities and possibly also to the regulation of both chloroplast and nuclear gene expression (Bruick and Mayfield, 1999; Rodermel, 2001; Surpin *et al.*, 2002). During recent years, it has become clear that the electron transfer routes and membrane complexes

involved in chloroplast redox chemistry are much more versatile than previously thought, and a number of new components participating in alternative electron transport pathways have been identified (for reviews, see Bendall and Manasse, 1995; Carol and Kuntz, 2001; Nixon, 2000; Nixon and Mullineaux, 2001).

Efficient plastid transformation techniques have been developed for the higher plant tobacco (Svab and Maliga, 1993; Svab *et al.*, 1990). Based on the homologous recombination system, the tobacco plastome can thus be targeted for manipulation and employed in generating mutants for studies of metabolic and regulatory processes taking place in plant chloroplasts. Plastid reverse genetics has made it possible, for example, to investigate the physiological role of the chloroplast NDH complex (Endo *et al.*, 1997;

Guedeney *et al.*, 1996; Quiles *et al.*, 1996; Sazanov *et al.*, 1998), and a number of novel tobacco mutants with inactivated *ndh* genes (*ndhA-C*, *H-K*) have been constructed (Burrows *et al.*, 1998; Kofer *et al.*, 1998; Shikanai *et al.*, 1998). Depletion of the NDH complex in these plants did not result in a specific phenotype under standard growth conditions. Nevertheless, the absence of the NDH complex led to a loss of post-illumination rise in chlorophyll fluorescence, considered to originate from the dark reduction of the plastoquinone (PQ) pool (Asada *et al.*, 1993; Feild *et al.*, 1998; Groom *et al.*, 1993), and thus provided direct evidence for an *in vivo* role of the NDH complex in PQ reduction with stromal reductants. This prompted the suggestion that the NDH complex participates in PSII-independent electron transport around PSI, as well as in a putative respiratory chain (chlororespiration) resembling the one found in cyanobacteria (Burrows *et al.*, 1998).

We constructed a *psbA* deletion mutant of tobacco to test how a complete inhibition of PSII activity, caused by lack of the *psbA*-encoded reaction center protein D1, affects the structure and function of chloroplast thylakoid membranes. Depletion of the *psbA* gene resulted in complete loss of all PSII subunits whereas the assembly and biogenesis of PSI and Cyt *bf* complexes were not affected. Moreover, free LHCII complexes accumulated in the thylakoid membrane. Most strikingly, the NDH complex and the plastid terminal oxidase (PTOX, Carol *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999) were more than 10-fold higher in thylakoid membranes of the $\Delta psbA$ mutant than in those of the wild type (WT). Increased NDH and PTOX accumulation was accompanied by a markedly enhanced NDH activity and by an increased capacity to oxidize NAD(P)H for P700⁺ reduction. These findings suggest the involvement of the NDH complex, and possibly other alternative routes, in sustaining thylakoid electron flow under conditions where the electron input by PSII is severely inhibited.

Results

Construction and phenotype of the tobacco $\Delta psbA$ mutant

Transplastomic shoots were selected by incubating the bombarded leaf segment on spectinomycin-containing (500 mg l⁻¹) shoot regeneration medium. Transformed, spectinomycin-resistant shoots were identified as green shoots on the bleached, bombarded leaf segments. The leaves on the shoots were variegated, containing light-green sectors. The light-green leaf sectors were excised aseptically and transferred to a plant regeneration medium. The light-green shoots regenerated from the sectors did not contain the *psbA* gene. The plastid genomes of these plants were the products of homologous recombination between

the promoter and 3'UTR of the native *psbA* gene and the promoter and 3'UTR of the chimeric *aadA* gene in the *psbA* cassette (Figure 1a). The *psbA* knockout shoots had a distinct phenotype. The youngest leaves (first and second) were green, whereas the older leaves gradually bleached out. This phenotype was maintained when the shoots were rooted and maintained on antibiotic-free plant maintenance medium. Uniform transformation of plastid genomes was confirmed by DNA gel blot analysis of *EcoRI*-digested total cellular DNA (Figure 1b). Hybridization was performed with a *psbA* probe to reveal the lack of this gene (Figure 1b) and with an *aadA* probe to check the size of the restriction fragments and verify that no additional deletions had occurred in the nearby genes (data not shown).

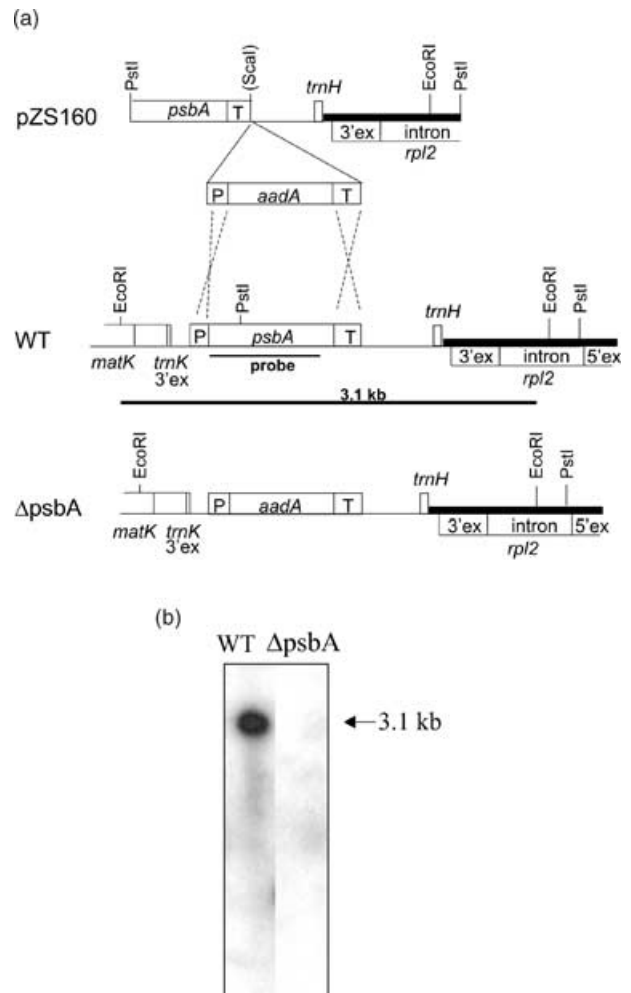


Figure 1. Construction of plastid *psbA* deletion mutants.

(a) Map of plastid transformation vector pZS162, the corresponding WT plastid genome region, and that of the *psbA* knockout plants ($\Delta psbA$). The spectinomycin resistance (*aadA*) gene coding region, and the *psbA* promoter (P) and 3'UTR (T) are marked. The hybridization probe is indicated as a solid bar under the *psbA* gene.

(b) DNA gel blot analysis of WT and $\Delta psbA$ tobacco using the probe indicated in (a). Total cellular DNA (8 μ g) was digested with the *EcoRI* restriction enzyme.

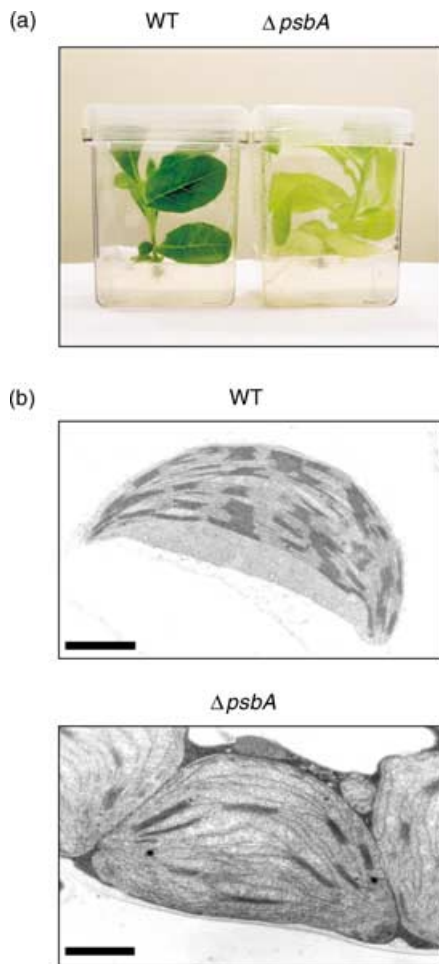


Figure 2. Wild-type and $\Delta psbA$ tobacco plants. (a) Phenotype of the plants grown under $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. (b) Electron micrographs of WT and $\Delta psbA$ chloroplasts. Scale bars represent $1 \mu\text{m}$.

The $\Delta psbA$ mutants were unable to grow photoautotrophically and were therefore propagated by tissue culture on a medium containing MS salts and 3% sucrose. As a result of a sensitivity of $\Delta psbA$ mutants to light, they were grown in very dim light ($30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$; Figure 2a); nevertheless, the leaves were light green. The experiments were carried out with the youngest and greenest expanded leaves. Examination of chloroplast ultrastructure by electron microscopy revealed drastically reduced size and number of grana stacks, and slightly swollen thylakoid membranes (Figure 2b).

77K fluorescence emission spectra of thylakoid membranes

We first determined the 77K fluorescence emission spectra of the mutant and WT thylakoids. This technique can distinguish between the characteristic emission bands belong-

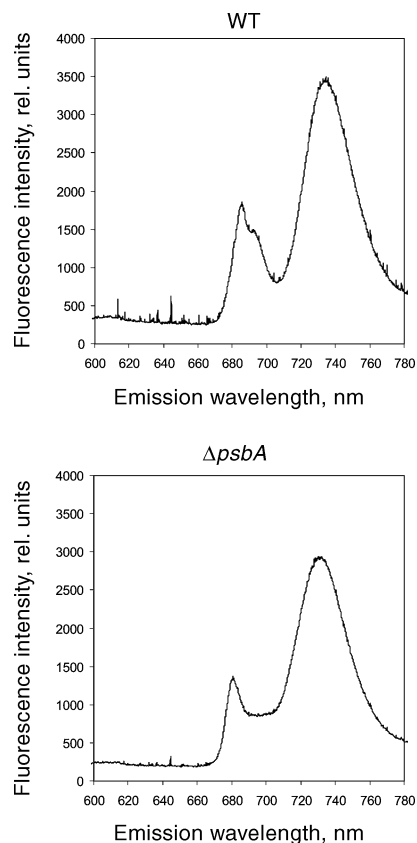


Figure 3. 77K fluorescence emission spectra measured from isolated thylakoids of WT and $\Delta psbA$ tobacco plants.

ing to PSII (chlorophyll-binding proteins CP43 and CP47, 685 and 695 nm, respectively), and to PSI (735 nm) (Krause and Weis, 1991), and hence provides an estimate of the relative amounts of chlorophyll-protein complexes associated with PSII and PSI. As shown in Figure 3, the spectrum of the mutant clearly lacked the emission peaks characteristic of PSII (685 and 695 nm). In accordance with this result, no PSII activity could be inferred from thylakoid membranes when assayed with an oxygen electrode using 2,6-dichloro-*p*-benzoquinone (DCBQ) as an artificial electron acceptor (data not shown). Interestingly, the 77K fluorescence emission spectrum of the mutant revealed a clear emission peak at 680 nm, indicating that at least part of the PSII light-harvesting antenna (LHCII) existed as free pigment-protein complexes in the thylakoid membrane, and was not associated with PSI.

Polypeptide composition of thylakoid membranes

A general polypeptide pattern of thylakoid membranes of the WT and $\Delta psbA$ mutant, obtained by Coomassie staining after SDS-PAGE, is shown in Figure 4(a). The equal staining intensity of proteins in the gel loaded on a chlorophyll basis

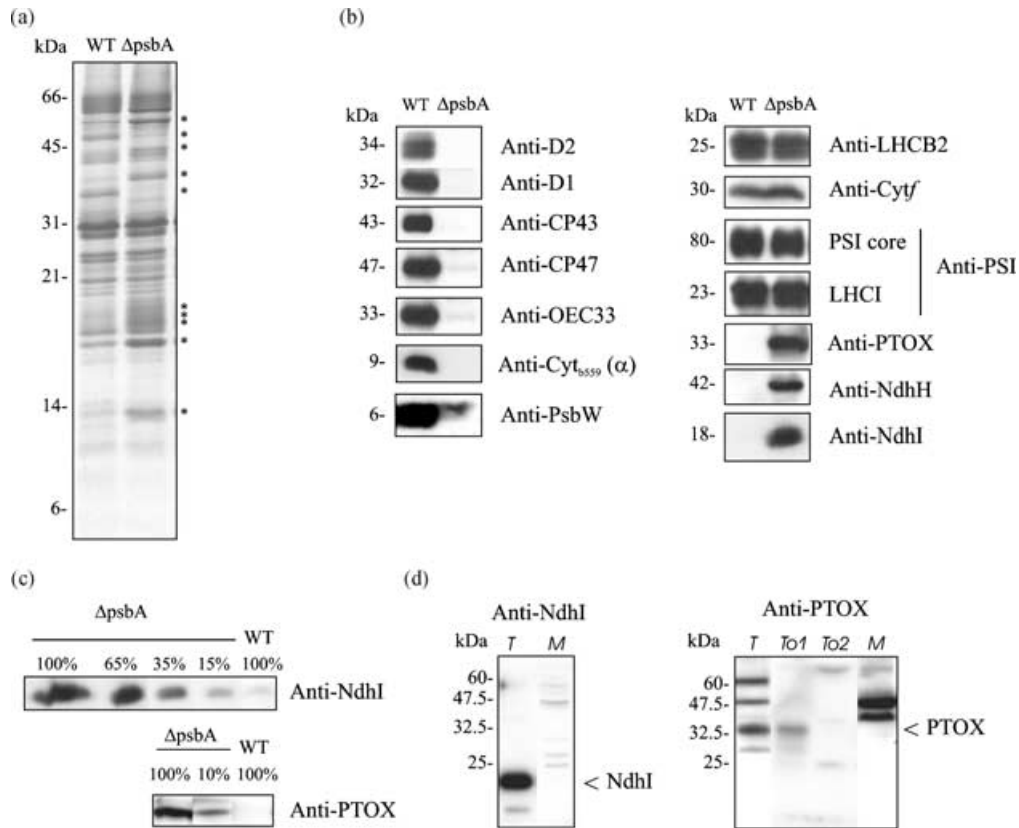


Figure 4. Biochemical analysis of WT and $\Delta psbA$ thylakoids.

(a) Thylakoid polypeptides separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie (2 μg chlorophyll per lane; stars denote the main differences in the protein band pattern between the WT and the mutant).

(b) Immunoblots (1 μg chlorophyll per lane, except for NdhH, NdhI, and PTOX, 15 μg) of thylakoid proteins from WT tobacco and $\Delta psbA$ plants.

(c) Estimation of NdhI and PTOX content in $\Delta psbA$ thylakoids with regard to WT levels. For the 100% samples, 15 μg chlorophyll (NdhI) or 9 μg chlorophyll (PTOX) was loaded.

(d) Test of possible cross-reactions of antisera with homologous mitochondrial proteins. Left panel, anti-NdhI: T, $\Delta psbA$ thylakoids, 100 μg protein; and M, purified mitochondrial membranes, 100 μg protein. Right panel, anti-PTOX: T, $\Delta psbA$ thylakoids, 90 μg protein; To1, protein extract of WT tomato, 50 μg protein; To2, protein extract of a tomato *ghost* mutant lacking PTOX, 50 μg protein; and M, purified mitochondria, 90 μg of protein. The arrowheads point to the protein bands corresponding to NdhI and PTOX.

indicated similar chlorophyll/protein ratios in the two samples. Nevertheless, several differences in the polypeptide pattern were noted (Figure 4a). Closer examination of the polypeptide composition of thylakoid membranes by immunoblot analysis confirmed the lack of D1 protein in the $\Delta psbA$ mutant (Figure 4b). In the absence of the D1 protein, D2 and Cyt b_{559} were also missing from the thylakoid membranes and only traces of CP43, CP47, and the OEC33 protein could be detected in overexposed films. In contrast to other PSII proteins, the PsbW polypeptide was present at reduced levels in the $\Delta psbA$ mutant, which is in agreement with a recent report on the association of this protein also with PSI (Hiyama *et al.*, 2000). Despite the lack of PSII, the protein levels of the LHCII antenna appeared normal with regard to other thylakoid proteins, as was the case also for Cyt f , the PSI core, and the PSI light-harvesting chlorophyll (LHCI) antenna. In sharp contrast to other thylakoid proteins, the relative amounts of PTOX and two tested subunits of the NDH complex (NdhH and NdhI) were

strikingly increased in the $\Delta psbA$ mutant (Figure 4b). As judged from a dilution series, this relative increase was more than 10-fold for both PTOX and the Ndh subunits (Figure 4c). Importantly, this was not because of a cross-reaction of the antibodies with the mitochondrial counterparts of the respective proteins, as neither the NdhI nor the PTOX antibodies recognized any proteins of the same size from purified tobacco leaf mitochondria (Figure 4d). As the PTOX antibody recognized several protein bands, the right PTOX protein band of *c.* 32 kDa (Figure 4d) was identified by using control samples, which consisted of protein extracts of a tomato WT plant (To1; Figure 4d) and a tomato mutant (*ghost*; 32) lacking PTOX (To2; Figure 4d).

NDH activities of the thylakoid membrane

In order to check whether the relative increase in NdhH and NdhI polypeptides was accompanied by an upregulation of NDH activities, thylakoid complexes mildly solubilized with

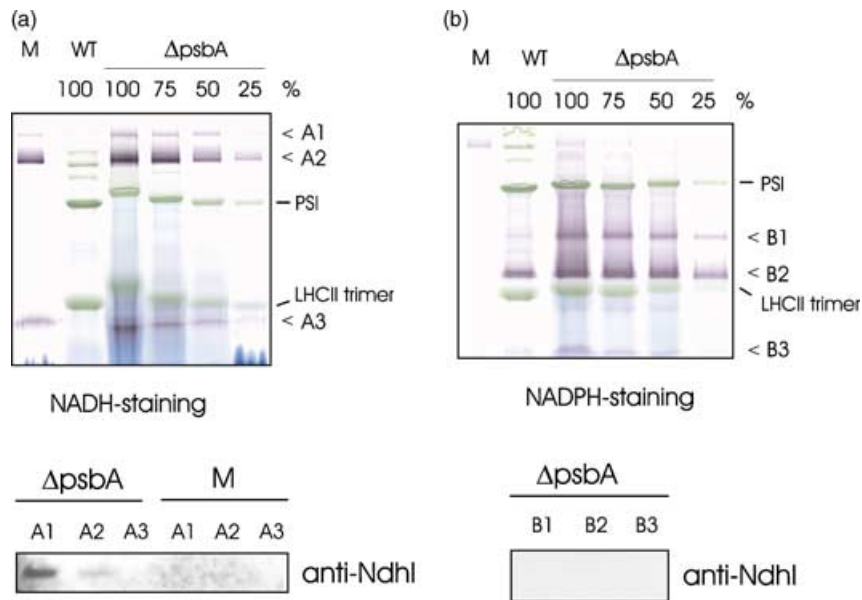


Figure 5. NDH activities in WT and $\Delta psbA$ thylakoids.

(a) NADH and (b) NADPH dehydrogenase activities of thylakoid (WT and $\Delta psbA$) and mitochondrial (M) membranes. Membranes were solubilized with 1% DM, and the protein complexes were resolved by BN-PAGE. The identity of marked complexes (PSI and LHCII trimers) was established by immunoblotting assays after running of the gel strip in a second dimension (not shown). NDH activity assays were performed after BN-PAGE as described in Experimental procedures using NBT and either NADH (a) or NADPH (b) as electron donors. 100% corresponds to 15 μg chlorophyll (=200 μg protein). M, purified mitochondria, 100 μg protein. A1–A3: activity bands after NADH staining. B1–B3: activity bands after NADPH staining. Analysis of bands A1–A3 ($\Delta psbA$ mutant 50% sample and mitochondria, M) and B1–B3 ($\Delta psbA$ mutant 50% sample) by denaturing SDS-PAGE in the second dimension and immunodetection with an NdhI-specific antibody is shown in lower panels of (a) and (b), respectively.

n-dodecyl β -D-maltoside (DM) were resolved by Blue-Native (BN)-PAGE, and the NDH activity was localized using either NADH or NAD(P)H as an electron donor and nitro blue tetrazolium (NBT) as an electron acceptor (Figure 5a). This assay was performed using equal chlorophyll amounts for all the samples, and therefore the lanes in one zymogram are comparable, as also revealed from similar PSI and LHCII amounts in immunoblots of the same samples (data not shown). As can be seen in Figure 5(a), staining with NADH-NBT resulted in three activity bands (bands A1–A3), whose intensity was higher in a 25% mutant sample than in the 100% WT sample. As NADH can also be oxidized by the mitochondrial respiratory complexes, the mitochondrial complex I being very similar in size to the chloroplastic NDH complex (Buchanan *et al.*, 2000; Sazanov *et al.*, 1998), and as mitochondrial membranes might copurify with thylakoid membranes during the isolation procedure, we used, as a control, purified mitochondria from tobacco leaves that were solubilized with DM in a similar way and ran and stained in parallel with the thylakoid samples. The amount of mitochondrial proteins loaded in the well corresponded to the amount of protein present in the 50% $\Delta psbA$ thylakoid sample (Figure 5a). All three bands (A1–A3) were present also in the mitochondrial sample. However, immunoblotting analysis of a dilution series of thylakoid and mitochondrial samples with antisera against the mitochondrial marker protein Cyt *c* revealed

only a maximum of 14% mitochondrial contamination in the $\Delta psbA$ thylakoid samples (not shown). Thus, small mitochondrial contamination cannot explain the differences in NADH dehydrogenase activity observed between the WT and the mutant. Furthermore, examination of the polypeptide composition of the excised activity bands by SDS-PAGE and immunoblotting revealed the presence of the NDH subunit NdhI in bands A1 and A2 of the $\Delta psbA$ thylakoid sample (taken from 50% sample), whereas no NdhI immunosignal could be detected in the corresponding bands of a mitochondrial sample containing similar protein amounts (Figure 5a, lower panel, anti-NdhI). Interestingly, the NdhI protein was mainly located in band A1, despite the fact that A2 was the most intense activity band in the gel. Therefore, it is possible that band A1 represents the intact NDH complex whereas the faster mobility bands A2 and A3 might represent smaller NDH subcomplexes. Indeed, NdhI could not be detected in the thylakoid band A3, suggesting that the observed enzymatic activity might result from an NDH subcomplex from which NdhI had dissociated.

Having demonstrated that the NDH complex was at least partly responsible for the NADH-dependent differences in dehydrogenase activities between the WT and the mutant, we tested the ability of the NDH complex to also use NADPH as a substrate. As shown in Figure 5(b), staining with NADPH-NBT revealed three bands in the WT and $\Delta psbA$ mutant (bands B1–B3). However, in contrast to the NADH

assay (Figure 5a), the differences between the WT and the mutant were at most twofold, and no slow-mobility complex(es) (<PSI) was present. Furthermore, NdhI was not detected in any of the NADPH-dependent activity bands (B1–B3; Figure 5b, lower panel).

Oxido-reduction of the PSI reaction center chlorophyll P700

We next studied the oxidation and reduction states of the PSI primary electron donor, P700, to further characterize the NDH activities observed in the zymograms. In order to be able to compare the effect of added reductants in such different systems as WT and $\Delta psbA$ mutant thylakoids, the contribution of PSII to PQ reduction was eliminated

by using 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU)-poisoned thylakoids isolated from dark-adapted (16 h) plants. The maximum level of photo-oxidizable P700 was first measured by excitation of WT and $\Delta psbA$ mutant thylakoids by saturating single turnover flash in the presence of DCMU and reduced 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) as an artificial electron donor to PSI. Typical kinetic traces of the flash-induced absorbance changes at 810 nm in WT and $\Delta psbA$ mutant thylakoid membranes are shown as an inset in Figure 6(a,b). The maximum level of photo-oxidizable P700 in $\Delta psbA$ mutant thylakoids was slightly higher than that in WT samples, being in accordance with the oxygraph measurements of PSI electron transport activities, 338 ± 37 and $374 \pm 41 \mu\text{mol O}_2 \text{mg chl}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectively. Moreover, the reduction kinetics

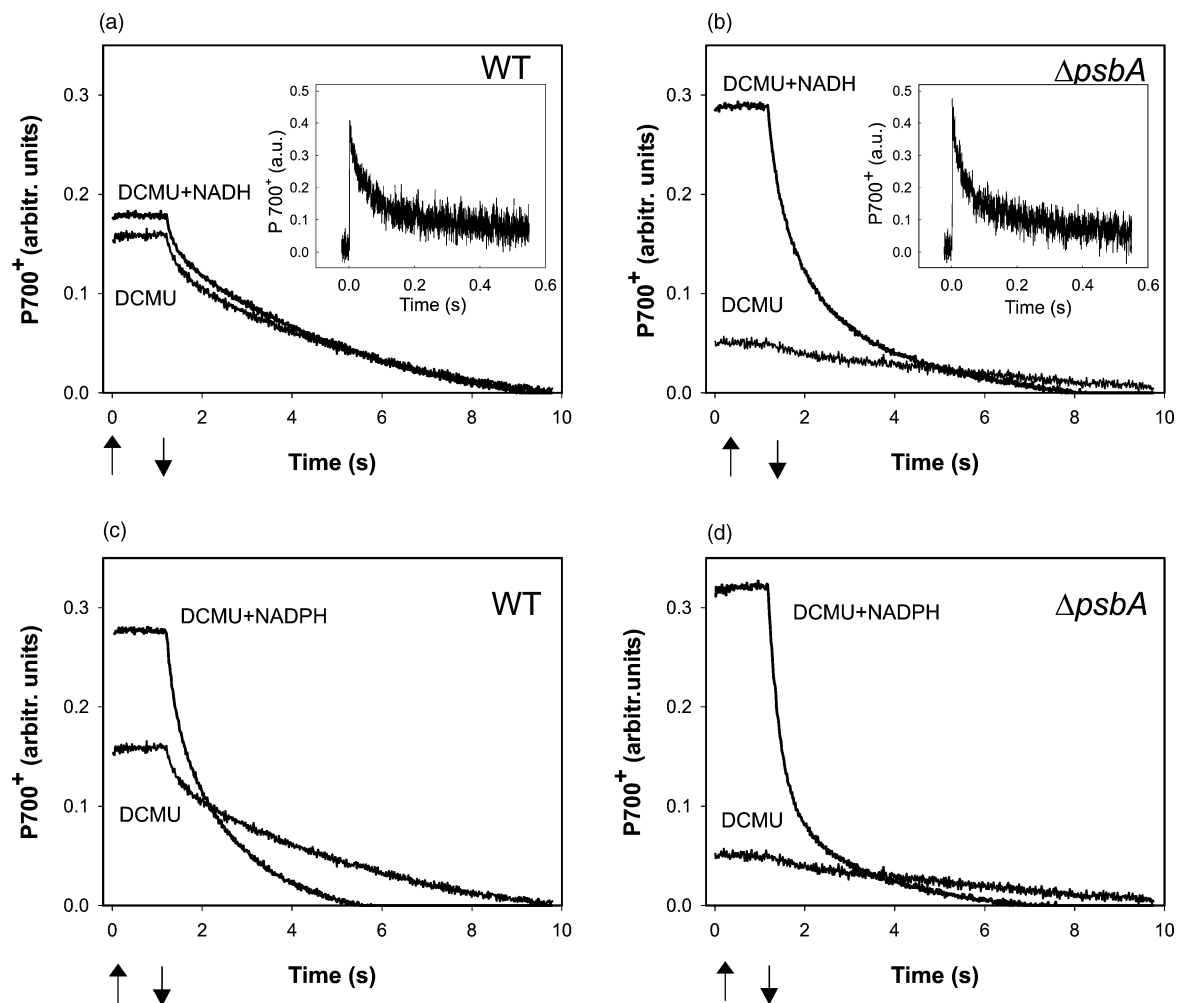


Figure 6. Oxidation and re-reduction of P700 in isolated thylakoids of WT and $\Delta psbA$ mutant. DCMU-poisoned thylakoids were illuminated for 30 sec under anaerobic conditions in the presence of exogenously added Fd followed by a 10-sec dark period. 30 consecutive cycles of light (1.2 sec; $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ of white light) and dark (8.8 sec) were applied to the sample and change in the redox state of P700 was monitored by absorbance changes at 810 nm (oxidation and increase in P700⁺ signal during the light phase and reduction of P700⁺ during the dark phase). The effect of NADH (2.4 mM, (a, b)) and NADPH (2.4 mM, (c, d)) on P700⁺ re-reduction was studied by adding these compounds to the sample after the DCMU curves had been recorded (DCMU + NADH and DCMU + NADPH curves; see Experimental procedures). Arrows indicate the starting (ON) and ending (OFF) points of the illumination period (1.2 sec). Each curve is an average of 15 repetitions. All measurements were carried out anaerobically. Insets in (a) and (b) show flash-induced maximum oxidation level of P700 and subsequent relaxation in darkness in WT and $\Delta psbA$ mutant, respectively.

of flash-induced $P700^+$ was nearly identical in both types of samples.

For the actual $P700$ oxido-reduction measurements, the thylakoid samples were first illuminated under anaerobic conditions with a long 30-sec pulse of white light ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) in the presence of exogenously added ferredoxin (Fd), followed by a 10-sec dark period. Illumination period in anaerobic conditions resulted in reduction of the exogenously added Fd and photo-oxidation of $P700$, which, during the following 10-sec dark period, slowly relaxed either through back reactions or/and cyclic electron flow. Subsequent 15 cycles of light (1.2 sec of light followed by 8.8 sec of darkness) in the presence of pre-reduced Fd and DCMU induced only limited photo-oxidation of $P700$ (Figure 6). The fact that the amplitude of the $P700$ oxidation signal was higher in WT thylakoids (Figure 6a, DCMU) than in the corresponding mutant sample (Figure 6b, DCMU) possibly indicates an enhanced capacity for Fd-mediated cyclic electron flow (Munekage *et al.*, 2002) in the $\Delta psbA$ mutant.

To check the ability of the thylakoid membranes to utilize stromal reductants for reduction of the PQ pool and PSI, the $P700^+$ re-reduction in darkness was measured in the presence of NADH or NADPH by adding these substrates (2.4 mM) of the NDH complex(es) after the first 15 DCMU curves had been recorded. Addition of NADH to WT sample hardly changed the kinetics of $P700$ oxido-reduction (Figure 6a), while in the case of the mutant, an increase in the light-induced $P700$ oxidation level and a dramatic acceleration of $P700^+$ re-reduction rate in the dark phase were evident (Figure 6b). This indicates that the mutant thylakoids have an enhanced capacity to utilize NADH for the input of electrons to the intersystem electron transfer chain (IEC), which induced rapid re-reduction of $P700^+$ in darkness. Concomitant production of NAD^+ apparently enhanced the steady-state level of $P700^+$ (Figure 6b) by producing electron acceptors for PSI through oxidation of pre-reduced Fd and thus preventing rapid charge recombinations. Addition of NADPH also had a substantial accelerating effect on $P700^+$ re-reduction kinetics. Nevertheless, this effect was nearly similar in both the WT and the mutant (Figure 6c,d).

LHCII protein phosphorylation

As judged from immunoblot assays, the relative amount of the LHCII antenna polypeptides was normal in the mutant, despite the absence of PSII (Figures 4b and 7, lower panel, anti-LHCB2). We next analyzed the phosphorylation state of LHCII polypeptides in dark-adapted (kept for 18 h in total darkness) and light-treated WT and $\Delta psbA$ plants (leaves harvested 5 h after the onset of illumination) by immunoblotting thylakoid samples with a phosphothreonine antibody that specifically recognizes the phosphorylated forms

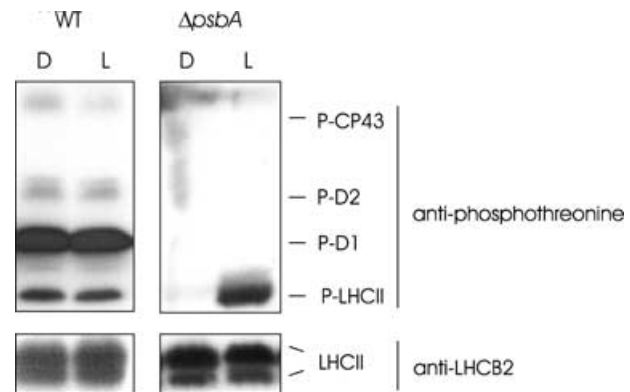


Figure 7. Phosphorylation of LHCII in thylakoids of dark-adapted (D) and illuminated (L) WT and $\Delta psbA$ tobacco leaves. The gel was loaded on a chlorophyll basis ($1 \mu\text{g}$ per lane). Immunodetection of the phosphorylated pool of PSII proteins (P-CP43, P-D2, P-D1, and P-LHCII) was performed with a phosphothreonine antibody and that of the total LHCII protein with an LHCB2-specific antibody. D, thylakoids isolated after an 18-h dark period; and L, thylakoids isolated after 5-h exposure to normal growth light.

of PSII proteins (Rintamäki *et al.*, 1997). As shown in Figure 7 (upper panel, anti-phosphothreonine), a clear phosphorylation of LHCII occurred in the light both in WT and $\Delta psbA$ thylakoids, indicating that the LHCII kinase could be activated in the mutant in spite of the loss of PSII activity. As reduced PQ in the Q_o site of the Cyt *b6f* complex is a prerequisite for activation of the LHCII kinase (Vener *et al.*, 1997; Zito *et al.*, 1999), this suggests that the PQ pool could be reduced by alternative electron transfer routes in the mutant. In WT control, low light normally maintained the phosphorylation of the LHCII proteins, which, however, remained strongly phosphorylated after the 18-h dark period, because of the sugar provided in the growth medium (Hou *et al.*, 2002). Noteworthy, despite the presence of sugar, the $\Delta psbA$ mutant oxidized the PQ pool in darkness, as suggested by a complete dephosphorylation of LHCII.

Transcript levels in the $\Delta psbA$ mutant

In order to check whether deletion of the *psbA* gene affected the accumulation of transcripts from other photosynthetic genes, we performed RNA gel blot analyses. In the case of *PTOX*, RT-PCR was used instead, as the amount of the *PTOX* transcripts is too low to be detected in RNA gel blots. As expected, no *psbA* (encoding D1) mRNA was detected in the mutant (Figure 8). This, in turn, did not appear to interfere with the accumulation of transcripts from the *psbD* (encoding the PSII D2 subunit) or the *psaA* genes (encoding the PSI A subunit). Also, the *ndhH* (encoding the NdhH subunit of the NDH complex) and the *PTOX* transcripts were present at comparable levels in WT and the mutant leaves (Figure 8). Comparable signals after probing for the plastid

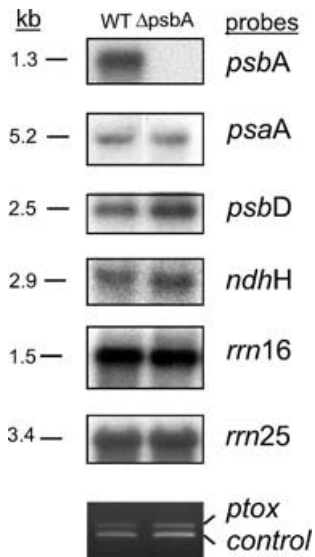


Figure 8. Accumulation of various plastid mRNAs and *PTOX* mRNA in WT and $\Delta psbA$ tobacco leaves.

Total cellular RNA was isolated from plants previously exposed for 5 h to light. Two micrograms of RNA was loaded per lane to probe for all other transcripts but the *ndh* transcripts, for which 10 μ g RNA was loaded. Only the major transcripts identified by each probe are shown. However, when present, the minor transcripts (e.g. from *psaA* and *psbD*) also showed equal amounts in WT and the $\Delta psbA$ mutant. mRNA levels of *PTOX* were determined by RT-PCR amplification of total cellular RNA. Equal amounts of total RNA were used in each reaction. Amplification of globin mRNA (added to the RT reaction mix) was used as a control for the RT-PCR reaction.

16S rRNA and cytoplasmic 25S rRNA with the *rrn16* and *rrn25* gene probes indicate uniform loading of the lanes. As a result of the scarcity of *ndh* transcripts, mRNA levels of *ndhH* and *ndhI* were also determined by real-time quantitative RT-PCR. This approach confirmed the results obtained by RNA gel blot analyses, revealing no differences between the WT and $\Delta psbA$ mutant (data not shown). Lack of increase in *ndhH*, *ndhI*, and *PTOX* mRNA levels suggests that the enhanced amounts of their respective protein subunits detected by immunoblotting were because of translational or post-translational regulation of gene expression.

Discussion

Major thylakoid proteins and protein complexes in psbA deletion mutant

To test how a complete depletion of the PSII complex affects the biogenesis and structure of the thylakoid membranes, we knocked out the *psbA* gene, encoding the reaction center protein D1 of PSII, by biolistic tobacco chloroplast transformation (Svab and Maliga, 1993; Svab *et al.*, 1990). Chloroplast ultrastructure of the $\Delta psbA$ mutant, examined by electron microscopy, revealed drastically

reduced size and number of grana stacks, and slightly swollen thylakoid membranes (Figure 2b). The mutant thylakoids were nearly completely devoid of all PSII core subunits, which contrasts with the results obtained for $\Delta psbA$ mutants in cyanobacteria and *Chlamydomonas*, in which CP43, OEC33, and Cyt *b*₅₅₉ proteins are present at WT levels (Morais *et al.* 1998; Nilsson *et al.*, 1990, 1992). Free LHCII complexes however accumulated in the thylakoid membrane of $\Delta psbA$ tobacco, and the assembly and biogenesis of PSI and Cyt *bf* complexes took place normally (Figure 4b,c). Interestingly, absence of the entire PSII complex had no effect on transcript accumulation from other plastome-encoded photosynthetic genes (Figure 8), although, in WT plants, changes in the rates of plastid gene transcription upon illumination with light favoring PSI or PSII were attributed to regulation by the redox state of PQ pool (Pfannschmidt *et al.*, 1999). Thus, it appears that changes in the redox state, induced by depletion of PSII, do not directly affect plastid transcript levels in the *psbA* knockout plants, and that the absence of all other PSII core subunits, besides the D1 protein, is apparently because of operation of efficient translational and post-translational regulatory mechanisms preventing accumulation of PSII subunits in the absence of assembly partners (Baena-González and Aro, 2002; Zerges, 2002).

Complexes involved in alternative electron transfer pathways accumulate in thylakoids of the ΔpsbA mutant

The artificial inactivation of PSII by deleting the gene for one of its core subunits resulted in an elevated activity of the alternative electron input pathways, which is in line with an apparent correlation in the literature between low or null functioning of PSII and upregulation of NAD(P)H-quinone reductases (NQRs, Casano *et al.*, 2000, 2001; Catalá *et al.*, 1997; Kubicki *et al.*, 1996; Martín *et al.*, 1996; Peltier and Schmidt, 1991). The NDH protein subunits were present in more than 10-fold higher amounts in the mutant than in the WT (Figure 4b,c), and the same was true for PTOX. Upregulation of the NDH subunits and PTOX in the $\Delta psbA$ mutant appeared to occur at a translational level, as the amounts of the corresponding mRNAs were comparable in WT and the $\Delta psbA$ mutant (Figure 8). Recently, it was reported that enhancement of NDH activity following photo-oxidative treatment is also under post-transcriptional control as an increase was detected only at protein level (Casano *et al.*, 2001).

NAD(P)H activity staining of thylakoid protein complexes in native gels revealed an over fourfold higher NADH-specific dehydrogenase activity in the mutant thylakoids (Figure 5a). This activity corresponded, at least partly, to the elevated level of the NDH complex, as evidenced by the presence of the NdhI subunit in two of the NADH activity bands (A1–A2; Figure 5a, lower panel). According to the

position of the bands in the native gel, the slower mobility band A1 possibly represents intact NDH complexes, whereas the faster mobility band A2 could correspond to an NDH subcomplex. As the Ndh1 protein is part of the peripheral module of the NDH complex (Friedrich and Scheide, 2000), it is conceivable that it easily dissociates during DM solubilization of thylakoid membranes. Therefore, the absence of Ndh1 from A3 does not rule out the possibility that this band also originates from the NDH complex, albeit in a state lacking the Ndh1 protein.

To test whether the increased NAD(P)H dehydrogenase activity of the mutant is also engaged in the flux of electrons to PSI, we measured P700⁺ re-reduction kinetics in darkness under various conditions (Figure 6). Both NADPH and NADH had a stimulating effect on the rate of P700⁺ reduction in DCMU-poisoned thylakoids, indicating that indeed the electrons provided by these reductants to the IEC are used to reduce P700⁺ (Figure 6a,d). In the case of NADPH, the extent of this effect was similar in the WT and $\Delta psbA$ mutant (Figure 6c,d). Addition of NADH, in contrast, caused a much greater acceleration of P700⁺ reduction in the mutant than in the WT (Figure 6a,b), in support of an upregulation of NADH-specific NQR activity in the absence of PSII (Figure 5). Strict conclusions on the identity of the enzyme(s) involved cannot, however, be drawn solely on the basis of the oxidized reductant, as the substrate specificity of these enzymes is still a matter of controversy, and in some cases, the enzymes have been reported to use both NADH and NADPH (Corneille *et al.*, 1998; Elortza *et al.*, 1999; Funk *et al.*, 1999; Guedeny *et al.*, 1996; Quiles and Cuello, 1998; Sazanov *et al.*, 1998).

Although the elevated amount of the NDH complex in the $\Delta psbA$ mutant appears to be involved in maintaining electron flux to PSI in the light, additional routes are known to be in operation as well. Two recent *in vivo* studies on WT and $\Delta ndhB$ plants point to an engagement of the NDH complex also in electron flow around PSI (Joët *et al.*, 2001, 2002). The need for the NDH complex was particularly evident under conditions of limited CO₂ availability induced by water stress (Joët *et al.*, 2001). The contribution of the NQRs to total electron flow is probably rather small under optimal growth conditions as reflected, for example, by the lack of phenotype of the various Δndh mutants in the absence of stress (Burrows *et al.*, 1998; Horváth *et al.*, 2000; Shikanai *et al.*, 1998). However, under strong inhibition of PSII activity or when the plants completely lack PSII function (as in the case of the $\Delta psbA$ mutant), these routes for electron input to the IEC are probably essential not only to support cyclic electron transport and ATP production in chloroplasts, but also to provide the chloroplast with reducing equivalents generated by PSI, particularly reduced Fd, which functions as an electron donor for several fundamental metabolic pathways in this organelle (Knaff, 1996).

Phosphorylation/dephosphorylation of LHCII in the $\Delta psbA$ mutant relies on alternative electron transfer pathways

Further evidence supporting the presence of alternative PQ-reducing activities in the $\Delta psbA$ thylakoids came from studies on LHCII protein phosphorylation, which became apparent in the mutant upon illumination of leaves (Figure 7). Phosphorylation of LHCII is known to be dependent on the binding of reduced PQ to the Q_o pocket of the Cyt *b6f* complex (Vener *et al.*, 1997; Zito *et al.*, 1999), with electrons being normally provided to PQ by PSII, as it is probably the case in the WT control. Indeed, blocking of PSII electron transfer with DCMU completely inhibits LHCII phosphorylation in the light (Rintamäki *et al.*, 2000). LHCII undergoes maximal phosphorylation at low light intensities, implying that a small amount of reduced PQ is sufficient for full activation of the kinase (Rintamäki *et al.*, 1997). In the case of the $\Delta psbA$ mutant, however, not even traces of PSII were present (77K fluorescence emission spectra, Figure 3; immunoblotting, Figure 4a; measurements of oxygen evolution, not shown). Hence, LHCII phosphorylation can be interpreted as an indication of PQ reduction by an NQR in the mutant.

On the other hand, in the dark, LHCII was totally dephosphorylated in $\Delta psbA$ plants grown on sucrose (Figure 7), which suggests an enhanced oxidation of PQH₂ in darkness as compared to the WT grown under similar conditions. The fact that WT plants grown on sucrose have LHCII protein phosphorylated in darkness, as opposed to WT plants grown on soil, results from alterations in the reduction state of PQ and the Cyt *b6f* complex caused by the sugar of the growth medium (Hou *et al.*, 2002). Efficient dephosphorylation of LHCII proteins in darkness in the $\Delta psbA$ plants is probably related to the increased PTOX amounts of the mutant (Figure 4b,c).

A question then arises why there is an over 10-fold increase in the relative amounts of PTOX in $\Delta psbA$ thylakoids as compared to the WT (Figure 4c). An explanation could be photo-oxidative stress generated by chlorophyll-binding free LHCII in the thylakoids. As revealed by 77K fluorescence emission spectra (Figure 3), at least part of LHCII is not connected to PSI in the $\Delta psbA$ mutant, and therefore the energy absorbed by the antenna chlorophylls is not expected to initiate an electron transfer chain. Instead, the excitation energy probably leads to the formation of chlorophyll triplets, which, if not quenched (e.g. by carotenoids), can result in the formation of extremely dangerous singlet oxygen (Foyer, 1997). As PTOX has been shown to be involved in carotenoid synthesis (Josse *et al.*, 2000), it is conceivable that it could have this function also in the $\Delta psbA$ mutant. In the light, PTOX cannot probably compete with PSI for oxidation of PQ, but its function in the $\Delta psbA$ mutant might be coupled with that of the NDH

complex in darkness for the synthesis of protective pigments.

In conclusion, in the $\Delta psbA$ mutant with complete loss of PSII centers, no alterations were observed in chloroplast gene expression at transcript level. Strikingly, in spite of equal protein levels of the PSI, Cyt *bf*, and LHCII complexes, the NDH and PTOX proteins were present in more than 10-fold higher amounts in the mutant than in the WT, apparently because of translational upregulation. Functional data obtained for the $\Delta psbA$ mutant reinforces the view that the upregulation of the NDH complex and probably also other NQRs in normal plants is crucial to support electron flow to PSI in thylakoids under conditions of PSII inactivation. Upregulation of PTOX under similar conditions is likely to exert protection against oxidative stress.

Experimental procedures

Construction of plastid transformation vector pZS162 and tobacco chloroplast transformation

Plasmid pZS160 is a pUC119 plasmid derivative, which carries a 2.4-kb *Pst*I fragment of the tobacco plastid genome (*Pst*I sites at nucleotides 154878 and 1334 in the plastid DNA, ptDNA) in which a *Bsp*HI site (nucleotide position 344 in the ptDNA) was converted to a *Scal* site by linker ligation (5'-AAAGTACTTT-3'). Plasmid pZS162 was obtained by ligating the chimeric spectinomycin resistance gene (*PpsbA::aadA::TpsbA*) as an *Eco*RI/*Hind*III fragment into the *Scal* site of plasmid pZS160. The chimeric *PpsbA::aadA::TpsbA* gene derives from plasmid pJS36, kindly provided by Jeffrey Staub. *PpsbA*, the chimeric *aadA* gene promoter, contains sequences between nucleotides 1735 (filled-in *Bgl*II site) and 1596 of the ptDNA. *TpsbA*, the 393-bp 3' region included for mRNA stability, is defined by a *Sau*3AI site (at bp 530) and a *Taq*I site (at bp 141) in the ptDNA.

Plastid transformation was carried out by the biolistic process. Transformation and regeneration of transgenic plants were carried out as described by Svab and Maliga (1993). Plants were grown aseptically on MS medium containing 3% sucrose (Murashige and Skoog, 1962) at 25°C and were illuminated for 16 h at a photosynthetic photon flux density of 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. WT tobacco plants were grown under the same conditions as the $\Delta psbA$ mutant.

Analysis of DNA and RNA

Total leaf DNA was isolated according to the hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) extraction procedure of Rogers and Bendich (1985), with slight modifications. Uniform transformation of plastid genomes was assessed by standard DNA gel blot analysis (Sambrook and Russell, 2001) by digesting DNA (8 μg) with *Eco*RI and using a DNA probe against the *psbA* coding region. The fragment used for the synthesis of the probe was amplified with the following pair of primers: 5'-CTC TTG ACC GAA TCT GTA ACC-3' (plastome nucleotides 870–890), and reverse 5'-GGA TAA CTA GCA CTG AAA ACC-3' (complementary to plastome nucleotides 1517–1537).

RNA gel blot analysis was carried out according to Silhavy and Maliga (1998). Two micrograms of total cellular RNA was loaded

per lane to probe for *psbA*, *psaA*, *psbD*, *rrn16*, and *rrn25* transcripts and 10 μg RNA to probe for *ndhH* transcripts. DNA probes were prepared by PCR using the following primers: *psbA*, 5'-GGA TAA CTA GCA CTG AAA ACC-3' and 5'-CTC TTG ACC GAA TCT GTA ACC-3'; *psaA*, 5'-CGT TGT ACC GAG TAG TTG GAT C-3' and 5'-CGA TAG CCA TAC CAG TGA TTT G-3'; *psbD*, 5'-TTA TGG ATG ACT GGT TAC GG-3' and 5'-TAG ACC GAC TAC TCC AAG AG-3'; *rrn25*, 5'-TCA CCT GCC GAA TCA ACT AGC-3' and 5'-GAC TTC CCT TGC CTA CAT TG-3'; *ndhH*, 5'-CCA TCT CCA AGG AAA AAC GC-3' and 5'-GGA GAA AAT TGC GGA AAA CC-3'; and *ndhI*, 5'-CTG ACA TTG GTA AGC GAC CC-3' and 5'-CAA TAC GAG CCG CCA GAT AC-3'. The *rrn16* probe was an *Apal*/*Eco*RV fragment derived from plasmid pPRV1 (Zoubenko *et al.*, 1994). Double-stranded DNA probes were prepared by random-primed ³²P-labeling.

RT-PCR analysis of *PTOX* transcripts was carried out as described by Josse *et al.* (2000), using the following primers: 5'-GTG CAY TTT GCI GAR AGC TGG AAT G-3' and 5'-TCA TYG TIT TIC AAT GIT CTG CIT CRT CAT CTC-3', where Y = C + T, R = A + G, and I = deoxyinosine. The amplification consisted of 24 cycles of 30 sec at 94°C, 20 sec at 45°C, and 20 sec at 72°C.

Isolation of thylakoid membranes and chlorophyll determination

Leaves were homogenized in ice-cold buffer containing 50 mM Hepes (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.33 M sorbitol, and 1% BSA. The homogenate was filtered through Miracloth and centrifuged for 5 min at 6000 *g*. The resulting pellet was washed with 10 mM Hepes (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, and 5 mM sorbitol and re-centrifuged, and the thylakoid membranes were finally suspended in 10 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, and 0.1 M sorbitol. For analysis of thylakoid protein phosphorylation, leaves were harvested 5 h after the lights were turned on and in the end of an 18-h dark period, and thylakoids were isolated under very dim green light with buffers containing 10 mM NaF to prevent protein dephosphorylation.

Chlorophyll was extracted in 80% (v/v) buffered acetone (25 mM Hepes-NaOH, pH 7.5) and quantified as described by Porra *et al.* (1989).

Isolation of mitochondria

Mitochondria were purified from tobacco leaves according to the protocol of Day *et al.* (1985), except that PVP was omitted from the Percoll gradients.

Gel electrophoresis, protein gel blots, and in-gel NDH determination

SDS-PAGE and immunodetection of thylakoid proteins were performed as described earlier by Baena-González *et al.* (1999). The gels were loaded on a chlorophyll basis. Polyclonal antibodies against the DE loop of D1 and D2 were purchased from Research Genetics, Inc., and phosphothreonine antibodies were purchased from Zymed Laboratories, Inc. Polyclonal antibodies against recombinant PTOX were produced as described by Cournac *et al.* (2000), and the identity of the protein band was confirmed by parallel electrophoresis of protein extracts from WT and a tomato mutant (*ghost*), which lacks the PTOX protein (Josse *et al.*, 2000). Other antibodies were kindly provided as follows: LHCB2 by Dr S. Jansson (Sweden); OEC33 by Dr T. Hundal (Sweden); PsbW by Dr W. Schröder (Sweden); Cyt *f* by Dr F.-A. Wollman (France); PSI,

CP43, and CP47 by Dr R. Barbato (Italy); α -Cyt b_{559} by Dr R. Herrmann (Germany); NdhH by Dr G. Peltier (France) and NdhI by Dr P. Nixon (UK).

For NDH assays, freshly isolated thylakoid samples were run in a BN acrylamide gel. BN-PAGE was carried out as described by Cline and Mori (2001), with the following modifications. Washed thylakoids were suspended in the re-suspension buffer (20% (w/v) glycerol and 25 mM BisTris-HCl, pH 7.0) at 1.0 mg chlorophyll ml^{-1} . In the case of mitochondrial samples, washed membranes were suspended in the re-suspension buffer at 13 mg protein ml^{-1} . An equal volume of the re-suspension buffer supplemented with 2% DM was added to the thylakoid suspension in a dropwise manner. Samples were briefly vortexed and kept for 5 min on ice. Non-solubilized material was removed by centrifugation at 20 000 g for 20 min. The supernatant was combined with 1 : 10 volume of 5% Serva blue G (100 mM BisTris-HCl, pH 7.0, 0.5 M 6-amino-*n*-caproic acid, and 30% glycerol) and applied to 1.0-mm-thick 4–12.5% acrylamide gradient gels in a Hoefer Mighty Small vertical electrophoresis unit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) connected to a cooling circulator (2–4°C). Electrophoresis was performed in the following manner: 75 V, 30 min; 100 V, 30 min; 125 V, 30 min; and 150 V, 30 min. At this point, when half of the gel was covered with dye, the cathode buffer was exchanged with buffer lacking the dye, and the electrophoresis was continued: 150 V, 30 min; 175 V, 30 min; and 200 V, 60 min. Activity staining was performed using NBT and NADH or NAD(P)H as substrates (Casano *et al.*, 2000).

Chlorophyll fluorescence measurements

Fluorescence emission spectra of thylakoid membranes were measured at 77K with a diode array spectrophotometer (S2000, Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) equipped with a reflectance probe as described by Keränen *et al.* (1999). Fluorescence was excited with white light below 500 nm (defined with LS500S and LS700S filters (Corion Corp., Holliston, MA, USA) placed in front of a slide projector), and the emission was recorded between 600 and 780 nm. A 100- μ l thylakoid sample (10 μ g chlorophyll ml^{-1} in 0.1 M sorbitol, 10 mM Hepes (pH 7.4), 5 mM NaCl, and 10 mM MgCl_2) isolated from plants previously exposed for 5 h to light was used.

Measurements of PSII and PSI activities

Photosystem II and PSI activities of thylakoids were measured with a Hansatech DW1 oxygen electrode (Hansatech Instruments Ltd., UK) at 20°C. PSII activity was measured as oxygen evolution in a reaction mixture (1 ml) consisting of 5 mM NH_4Cl , 0.33 M sorbitol, 40 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 5 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 M glycine betaine, 1 mM KH_2PO_4 , and thylakoids equivalent to 20 μ g chlorophyll. DCBQ (0.25 mM) was used as an electron acceptor. PSI activity was recorded as net oxygen consumption in a reaction mixture (1 ml) consisting of 40 mM Na-phosphate (pH 7.4), 1 mM NaCl, 0.6 mM NaN_3 , 0.12 mM methylviologen (MV), 0.3 mM DCPIP, 32 mM Na-ascorbate, and 0.01 mM DCMU.

Determination of P700 redox state

The redox state of P700 in thylakoids isolated from dark-adapted (16 h) plants was determined by absorbance changes at 810 nm, using A_{860} as a reference. Absorbance changes were monitored using an ED-P700DW unit attached to the PAM 101 fluorometer. Measurements were performed under anaerobic conditions in a

temperature-regulated cuvette (25°C) in 0.5 ml of buffer consisting of 50 mM Tricine (pH 7.5), 5 mM MgCl_2 , 6 mM glucose, 10 μ M DCMU, 2 mM NH_4Cl , 400 U ml^{-1} catalase, and 50 μ M Fd (Scheller, 1996). The mixture was thoroughly flushed with argon before 2 U of glucose oxidase and thylakoids (25 μ g chlorophyll) were added. An initial illumination period (1000 μ mol photons $\text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) of 30 sec was applied to reduce Fd in the presence of DCMU. After that, the samples were kept in darkness for 10 sec followed by 30 cycles of actinic light (1.2 sec, 1000 μ mol photons $\text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) and darkness (8.8 sec). First, 15 curves were recorded from the sole DCMU-treated thylakoids. Thereafter, NADH or NAD(P)H (2.4 mM) was added to the mixture through a small hole on the side of the cuvette and 15 more curves were recorded. From the 15 curves of each treatment (DCMU, DCMU + NADH/NAD(P)H), an average curve was calculated and a minimum of two independent average curves were obtained for each treatment.

Maximum level of photo-oxidizable P700 in thylakoid membranes was determined by using 532-nm single turnover flash (4 nsec, and an energy of approximately 1.2 mJ cm^{-2}) provided from a Nd:YAG laser (Minilite, Continuum, Santa Clara, CA, USA) in the presence of 6 μ M DCPIP and 10 mM Na-asc as an artificial electron donor and 20 μ M DCMU. The 0.5-ml reaction mixture contained 25 μ g chlorophyll in the buffer consisting of 50 mM Tricine (pH 7.5), 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, and 0.4 M sucrose.

Electron microscopy

For electron microscopy, the leaf was fixed with 3% glutaraldehyde in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, and post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer. After dehydration in an alcohol series, the samples were embedded in Epon. The thin sections, cut with KB ultramicrotome IV (LKB, Bromma, Sweden), were stained with uranyl acetate and Reynolds lead citrate, and examined with a Jeol Jem 1200EX (Tokyo, Japan) electron microscope.

Acknowledgements

We thank Drs S. Jansson, G. Peltier, K. Steinmüller, T. Hundal, F.-A. Wollman, R. Barbato, and P. Nixon for the generous gift of antibodies and Dr J. Staub for plasmid PJS36. Dr E. Tyystjärvi and M. Keränen are thanked for valuable advices regarding biophysical measurements and Dr S. Corneille for a critical reading of the manuscript. This work was supported by the Academy of Finland (E.-M.A.), by the Finnish Ministry for Agriculture and Forestry (NKJ grant) (E.-M.A.), by the Emil Aaltonen Foundation (E.B.-G.) and by NSF Grants MCB 96-30763 and MCB 99-05043 (P.M.).

References

- Asada, K., Heber, U. and Schreiber, U. (1993) Electron flow to the intersystem chain from stromal components and cyclic electron flow in maize chloroplasts, as detected in intact leaves by monitoring redox change of P700 and chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Physiol.* **34**, 39–50.
- Barber, J. (1998) Photosystem two. *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 269–277.
- Baena-González, E. and Aro, E.-M. (2002) Biogenesis, assembly and turnover of photosystem II units. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **357**, 1451–1460.
- Baena-González, E., Barbato, R. and Aro, E.-M. (1999) Role of phosphorylation in the repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. *Planta*, **208**, 196–204.

- Bendall, D.S. and Manasse, R.S.** (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 23–38.
- Bruick, R.K. and Mayfield, S.P.** (1999) Light-activated translation of chloroplast mRNAs. *Trends Plant Sci.* **4**, 190–195.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L.** (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD, USA: American Society of Plant Physiologists.
- Burrows, P.A., Sazanov, L.A., Svab, Z., Maliga, P. and Nixon, P.J.** (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J.* **17**, 868–876.
- Carol, P. and Kuntz, M.** (2001) A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci.* **6**, 31–36.
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G. and Kuntz, M.** (1999) Mutations in the *Arabidopsis* gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*, **11**, 57–68.
- Casano, L.M., Zapata, J.M., Martín, M. and Sabater, B.** (2000) Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. Plastocyanin as electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 942–948.
- Casano, L.M., Martín, M. and Sabater, B.** (2001) Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplastic Ndh complex under photooxidative stress in barley. *Plant Physiol.* **125**, 1450–1458.
- Catalá, R., Sabater, B. and Guera, A.** (1997) Expression of the plastid *ndhF* gene product in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of developing barley seedlings. *Plant Cell Physiol.* **38**, 1382–1388.
- Cline, K. and Mori, H.** (2001) Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J. Cell Biol.* **154**, 719–729.
- Corneille, S., Cournac, L., Guedeney, G., Havaux, M. and Peltier, G.** (1998) Reduction of the plastoquinone pool by exogenous NADH and NAD(P)H in higher plants chloroplasts. Characterization of a NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1363**, 59–69.
- Cournac, L., Redding, K., Ravenel, J., Rumeau, D., Josse, E.-M., Kuntz, M. and Peltier, G.** (2000) Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J. Biol. Chem.* **275**, 17256–17262.
- Day, D.A., Neuburger, M. and Douce, R.** (1985) Biochemical characterization of chlorophyll-free mitochondria from pea leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **12**, 219–228.
- Elortza, F., Asturias, J.A. and Arizmendi, J.M.** (1999) Chloroplast NADH dehydrogenase from *Pisum sativum*: characterization of its activity and cloning of *ndhK* gene. *Plant Cell Physiol.* **40**, 149–154.
- Endo, T., Mi, H., Shikanai, T. and Asada, K.** (1997) Donation of electrons to plastoquinone by NAD(P)H dehydrogenase and by ferredoxin-quinone reductase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **38**, 1272–1277.
- Feild, T.S., Nedbal, L. and Ort, D.R.** (1998) Nonphotochemical reduction of the plastoquinone pool in sunflower leaves originates from chlororespiration. *Plant Physiol.* **116**, 1209–1218.
- Foyer, C.** (1997) Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* (Scandalios, J.G., ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 587–621.
- Friedrich, T. and Scheide, D.** (2000) The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett.* **479**, 1–5.
- Funk, E., Schäfer, E. and Steinmüller, K.** (1999) Characterization of the Complex I homologous NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase (NDH-complex) of maize chloroplasts. *J. Plant Physiol.* **154**, 16–23.
- Groom, Q.J., Kramer, D.M., Crofts, A.R. and Ort, D.R.** (1993) The non-photochemical reduction of plastoquinone in leaves. *Photosynth. Res.* **36**, 205–215.
- Guedeney, G., Corneille, S., Cuine, S. and Peltier, G.** (1996) Evidence for an association of *ndhB*, *ndhJ* gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Lett.* **378**, 277–280.
- Hiyama, T., Yumoto, K., Satoh, A., Takahashi, M., Nishikido, T., Nakamoto, H., Suzuki, K. and Hiraide, T.** (2000) Chromatographic separation of a small subunit (PsbW/PsaY) and its assignment to Photosystem I reaction center. *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 117–124.
- Horváth, E., Peter, S.O., Joët, T., Rumeau, D., Cournac, L., Horváth, G.V., Kavanagh, T.A., Schäfer, C., Peltier, G. and Medgyesy, P.** (2000) Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol.* **123**, 1137–1349.
- Hou, C.-X., Pursiheimo, S., Rintamäki, E. and Aro, E.-M.** (2002) Metabolic and environmental control of LHClI protein phosphorylation: revealing the mechanism for dual regulation of the LHClI kinase. *Plant Cell Environ.* **25**, 1515–1525.
- Joët, T., Cournac, L., Horváth, E.M., Medgyesy, P. and Peltier, G.** (2001) Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around Photosystem I. *Plant Physiol.* **125**, 1919–1929.
- Joët, T., Cournac, L., Peltier, G. and Havaux, M.** (2002) Cyclic electron flow around photosystem I in C(3) plants. *In vivo* control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex. *Plant Physiol.* **128**, 760–769.
- Josse, E.-M., Simkin, A.J., Gaffe, J., Laboure, A.M., Kuntz, M. and Carol, P.** (2000) A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol.* **123**, 1427–1436.
- Keränen, M., Aro, E.-M. and Tyystjärvi, E.** (1999) Excitation-emission map as a tool in studies of photosynthetic pigment-protein complexes. *Photosynthetica*, **37**, 225–237.
- Knaff, D.B.** (1996) Ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D.R. and Yocum, C.F., eds). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 333–361.
- Kofer, W., Koop, H.-U., Wanner, G. and Steinmüller, K.** (1998) Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 166–173.
- Krause, G.H. and Weis, E.** (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 313–349.
- Kubicki, A., Funk, E., Westhoff, P. and Steinmüller, K.** (1996) Differential expression of plastome-encoded *ndh* genes in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the C4 plant *Sorghum bicolor* indicates that the complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase is involved in cyclic electron transport. *Planta*, **199**, 276–281.
- Martín, M., Casano, L.M. and Sabater, B.** (1996) Identification of the product of *ndhA* gene as a thylakoid protein synthesized in

- response to photooxidative treatment. *Plant Cell Physiol.* **37**, 293–298.
- Morais, F., Barber, J. and Nixon, P.** (1998) The chloroplast-encoded alpha subunit of cytochrome *b*-559 is required for assembly of the photosystem two complex in both the light and the dark in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **273**, 29315–29320.
- Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M. and Shikanai, T.** (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell*, **110**, 361–371.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.
- Nanba, O. and Satoh, K.** (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome *b*-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 109–112.
- Nilsson, F., Andersson, B. and Jansson, C.** (1990) Photosystem II characteristics of a constructed *Synechocystis* 6803 mutant lacking synthesis of the D1 polypeptide. *Plant Mol. Biol.* **14**, 1051–1054.
- Nilsson, F., Simpson, D.J., Jansson, C. and Andersson, B.** (1992) Ultrastructural and biochemical characterization of a *Synechocystis* 6803 mutant with inactivated *psbA* genes. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 340–347.
- Nixon, P.J.** (2000) Chlororespiration. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **355**, 1541–1547.
- Nixon, P. and Mullineaux, C.W.** (2001) Regulation of photosynthetic electron transfer. In *Advances in Photosynthesis, Regulatory Aspects of Photosynthesis* (Aro, E.-M. and Andersson, B., eds). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 533–555.
- Peltier, G. and Schmidt, G.W.** (1991) Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4791–4795.
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A. and Allen, J.F.** (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, **397**, 625–628.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E.** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll *a* and *b* with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 384–394.
- Quiles, M.J. and Cuello, J.** (1998) Association of ferredoxin-NADP oxidoreductase with the chloroplastic pyridine nucleotide dehydrogenase complex in barley leaves. *Plant Physiol.* **117**, 235–244.
- Quiles, M.J., Albacete, M.E., Sabater, B. and Cuello, J.** (1996) Isolation and partial characterization of the NADH dehydrogenase complex from barley chloroplast thylakoids. *Plant Cell Physiol.* **37**, 1134–1142.
- Quiles, M.J., García, A. and Cuello, J.** (1999) Localization of the chloroplast NDH complex in stroma thylakoids from barley. *Plant Sci.* **146**, 17–25.
- Rintamäki, E., Salonen, M., Suoranta, U.-M., Carlberg, I., Andersson, B. and Aro, E.-M.** (1997) Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation *in vivo*. Application of phosphothreonine antibodies to analysis of thylakoid phosphoproteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 30476–30482.
- Rintamäki, E., Martinsuo, P., Pursiheimo, S. and Aro, E.-M.** (2000) Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11644–11649.
- Rodermel, S.** (2001) Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci.* **6**, 471–478.
- Rogers, S.O. and Bendich, A.J.** (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plants tissues. *Plant Mol. Biol.* **5**, 69–76.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 6.33–6.46.
- Sazanov, L.A., Burrows, P. and Nixon, P.J.** (1998) The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1319–1324.
- Scheller, H.V.** (1996) *In vitro* cyclic electron transport in barley thylakoids follows two independent pathways. *Plant Physiol.* **110**, 187–194.
- Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K. and Yokota, A.** (1998) Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9705–9709.
- Silhavy, D. and Maliga, P.** (1998) Mapping of the promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the *iojap* maize mutant. *Curr. Genet.* **33**, 340–344.
- Surpin, M., Larkin, R.M. and Chory, J.** (2002) Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *Plant Cell*, **14**, S327–S338.
- Svab, Z. and Maliga, P.** (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 913–917.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. and Maliga, P.** (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8526–8530.
- Vener, A.V., van Kan, P.J., Rich, P.R., Ohad, I. and Andersson, B.** (1997) Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *bf* mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1585–1590.
- Wu, D., Wright, D.A., Wetzell, C., Voytas, D.F. and Rodermel, S.** (1999) The *IMMUTANS* variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell*, **11**, 43–55.
- Zerges, W.** (2002) Does complexity constrain organelle evolution. *Trends Plant Sci.* **7**, 175–182.
- Zito, F., Finazzi, G., Delosme, R., Nitschke, W., Picot, D. and Wollman, F.-A.** (1999) The Qo site of cytochrome *b6f* complexes controls the activation of the LHClI kinase. *EMBO J.* **18**, 2961–2969.
- Zoubenko, O.V., Allison, L.A., Svab, Z. and Maliga, P.** (1994) Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucl. Acids Res.* **22**, 3819–3824.