

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene
Faculté des Sciences Biologiques



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister
En Biologie et Physiologie Cellulaire et Moléculaire

Par M^{elle} DRAI Laila

Thème

**Effet d'un stress hydrique sur la formation des
protéines de stress et quelques activités
enzymatiques chez deux variétés de lentille
*Lens culinaris L.***

Soutenu publiquement le 13 Mars 2012 devant le jury composé de:

Mr AMIROUCHE Rachid	Professeur à l'USTHB	Président
Mme. ABROUS Ouzna	Professeur à l'USTHB	Directrice de mémoire
Mr KACI. Y	Professeur à l'USTHB	Examinateur
Mme GACEB. R	Maitre de conférence à l'USTHB	Examinatrice
Mr DJEBBAR Réda	Maitre-assistant/A à l'USTHB	Invité

Résumé

Le but de ce travail est d'étudier la variabilité de la réponse physiologique au déficit hydrique de deux variétés de lentille *Lens culinaris* L, la variété Balkan 755 Amir et la variété Champagne. Un intérêt est porté aux modifications quantitatives et qualitatives des protéines ainsi qu'à l'activité d'une enzyme anti-oxydante, la catalase. Le stress perturbe le statut hydrique des plantules des deux variétés ce qui induit une accumulation de la proline qui joue un rôle dans l'ajustement osmotique. Le déficit hydrique provoque également une diminution des pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes). Le stress oxydatif qui accompagne ce stress hydrique génère des espèces réactives d'oxygène responsables de la peroxydation des lipides, particulièrement les phospholipides membranaires. Cette peroxydation estimée en substances réactives à l'acide barbiturique dont le malonyldialdéhyde (MDA) ou en termes d'intégrité membranaire est plus importante chez la var. Champagne. Pour contrer ce stress oxydatif, les activités de la catalase et de l'ascorbate peroxydase, ont augmentées.

Au niveau protéique, nous enregistrons une baisse de la teneur des protéines totales, résultat d'une moindre assimilation chlorophyllienne et minérale. Quant à la composition qualitative, nous avons mis en évidence par SDS-PAGE l'apparition de deux nouvelles protéines de stress d'environ 30 kDa et 60 kDa. La première serait :

- Une CDSP 32 (chloroplastic drought-induced stress protein), protéine de type thioredoxine localisé dans le chloroplaste dont l'accumulation est induite par un stress sévère. Elle jouerait un rôle dans le maintien du potentiel redox thiol-disulfite durant le déficit hydrique
- Ou une CDSP 34, une protéine thylakoïdienne dont la synthèse est induite par un stress hydrique progressif et modéré. Le rôle supposé de cette protéine chloroplastique serait en relation avec la tolérance de l'appareil photosynthétique à la déshydratation.

La deuxième protéine de stress, observée uniquement chez la var. Balkan, serait une dehydrine (CPA 60) connue pour s'accumuler en plus grande quantités chez les géotypes résistants. Les dehydrines sont des protéines induites par des stress environnementaux qui provoquent une déshydratation des cellules.

Mots clés : *Lens culinaris* L, arrêt d'arrosage, physiologie, morphologie, activité antioxydante, SDS-PAGE.

*« Il m'a fallu des années pour le comprendre,
mais maintenant je sais : le courage n'est pas
l'absence de peur, mais plutôt la force
de continuer à aller de l'avant malgré la peur. »
Paulo Coelho.*

Remerciements

A l'issue de ce travail de recherche, je tiens tout particulièrement à remercier Madame ABROUS Ouzna, Professeur à la Faculté des Sciences Biologique à l'université l'USTHB, pour avoir accepté de diriger avec beaucoup d'attention et de soin ce mémoire. Je lui suis très reconnaissante pour sa disponibilité. Je lui dois beaucoup pour le contenu du travail présenté, pour ses critiques constructives et son aide aux différentes entraves rencontrées, pour sa gentillesse et ses qualités humaines.

Je remercie également Mr DJEBBAR Réda, Maître assistant à l'USTHB, pour sa bienveillance et son soutien permanent, d'avoir prêté un intérêt constant au sujet du mémoire et surtout pour sa disponibilité, son aide et ses bons conseils. Je le remercie aussi pour m'avoir initiée à la recherche et m'avoir promulgué ses conseils judicieux au cours de mon parcours, aux bons moments passés à parler d'autres choses que de science. Encore merci de m'avoir donné la chance de prouver mes compétences. Qu'il trouve ici l'expression de mes plus vifs et sincères remerciements. Merci pour tout.

J'adresse ma gratitude à Mr AMIROUCHE Rachid, Professeur à l'USTHB, pour avoir accepté de présider le jury de mon mémoire.

Je remercie également Madame GACEB. Rabea, Maître de conférences et Monsieur KACI. Yahia, Professeur, à l'USTHB, pour avoir accepté d'examiner ce travail et de participer au jury de ce mémoire.

Je remercie le Directeur et tous les membres du laboratoire de physiologie végétale, trop nombreux pour les citer, de m'avoir fait une place au sein du laboratoire pour réaliser au mieux mon mémoire. Mon travail aurait été pénible sans la bonne ambiance.

Un merci plus spécial pour KHELIF Leila, AMMI Katia et BOUCELHA Lylia qui se sont toujours montrées disponibles pour me donner un coup de main.

Je tiens également à remercier le personnel du laboratoire de Biochimie de l'université BOUGUERRA Boumerdes, et particulièrement Mlle AIT IDIR Djouher, pour m'avoir aidée à réaliser une partie de mon travail

A mes très chères amies Lydia et Amel, pour leur bonne humeur perpétuelle et surtout pour leur amitié indéfectible.

Mes plus vifs remerciements iront à des êtres exceptionnels, mes parents, qui se sont sacrifiés tout au long de leur vie pour me garantir un bel avenir. Je tiens à remercier également tous les autres membres de ma famille.

A tous ceux qui ont participé de loin ou de près à l'élaboration de ce modeste travail, j'adresse un sincère remerciement.

Liste des figures

Figure 1 : Les phases successives d'un stress (d'après Selye, 1936, 1973 et Stockers, 1947 ; In Larcher, 1995).

Figure 2 : la production des radicaux libres et leur détoxification au niveau de la chaîne photosynthétique. (Foyer et Noctor, 2000)

Figure 3 : Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale (Parent *et al.*, 2008)

Figure 4 : schéma de peroxydation des lipides membranaires

Figure 5 : Cycle du glutathion (Rousseau, 1999)

Figure 6 : Schéma des principales voies de détoxification des ROS (Reactive oxygen species) (Bray *et al.*, 2000)

Figure 7 : Voie de biosynthèse de la proline chez les plantes. La voie dérivée du glutamate est bien établie (flèches noires). En rouge la voie de l'ornithine dont l'importance reste à déterminer. (Bray *et al.*, 2000)

Figure 8 : Processus de la perception du signal à la mise en place des mécanismes de résistance et/ou tolérance par la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse de la plante à des stress abiotiques. (Wang *et al.*, 2003)

Figure 9 : Rôle des protéines HSP lors d'un stress (Wang *et al.*, 2003)

Figure 10 : Allure générale de *Lens culinaris L*

Figure 11 : Graines de lentille (variété Balkan et variété Champagne)

Figure 12 : Courbe étalon des protéines (BSA)

Figure 13 : Courbe étalon de la proline

Figure 14 : Courbe étalon des sucres solubles (glucose)

Figure 15 : la réaction de l'acide thiobarbiturique avec le MDA

Figure 16 : Courbe étalon du 1, 1, 3, 3, tétraméthoxypropane (Précurseur du malondialdéhyde)

Figure 17 : effets du stress hydrique sur la teneur relative en eau des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 18 : Effet du stress sur la croissance linéaire de la partie aérienne des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 19 : Effets du stress hydrique sur la teneur en chlorophylles totales des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 20 : effets du stress hydrique sur la teneur en caroténoïdes des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 21 : Effets du stress hydrique sur la teneur en sucres solubles des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 22 : Effets du stress hydrique sur la teneur en proline des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 23 : Effets du stress hydrique sur la teneur en protéines totales des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 24 : Effets du stress hydrique sur la fuite relative d'électrolytes des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 25 : Effets du stress hydrique sur la teneur en MDA des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 26 : Effets du stress hydrique sur l'activité enzymatique catalase des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 27 : Effets du stress hydrique sur l'activité enzymatique ascorbate peroxydase des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 28 : Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines totales des feuilles de la variété Balkan 775 Amir chez les plantules témoins et stressées âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Figure 29 : Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines totales des feuilles de la variété Champagne chez les plantules témoins et stressées âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

Liste des tableaux

Tableau I : Mesures des paramètres morphologiques et biochimiques des plantules témoins des deux variétés de lentille.

Tableau II : Effets du stress hydrique sur le rapport chl *a*/chl *b* des deux variétés de lentille.

Sommaire

I- Introduction.....	1
II- Généralités.....	3
II.1- Description de <i>Lens culinaris</i> L.....	3
II.2- Stress et plante.....	3
II.2.1- Les phases successives du stress.....	3
II.2.1.1- La phase d'alarme.....	3
II.2.1.2- La phase de résistance.....	4
II.2.1.3- La phase d'épuisement.....	4
II.2.2-Le stress hydrique.....	5
II.2.3-Le statut hydrique de la plante.....	5
II.2.3.1- La teneur relative en eau.....	6
II.2.3.2- Le potentiel hydrique foliaire.....	6
II.2.4- Les stratégies de réponses.....	6
II.2.5- Les conséquences du stress hydrique	7
II.2.5.1- Limitations de la croissance des organes de la plante	7
II.2.5.2- Effet du stress hydrique sur la photosynthèse.....	8
II.2.5.3- Le stress oxydatif	8
II.2.5.3.1- Les sites de formation des ROS	9
- Chloroplaste	9
- Le peroxydome.....	10
- La mitochondrie	10
- La membrane plasmique	10
II.2.5.3.2- L'effet des espèces actives d'oxygène sur les compartiments cellulaires	11
Péroxydation des lipides.....	11
II.2.5.3.3- Les systèmes de détoxification	12
a- Le système non enzymatique.....	13
b- Les systèmes enzymatiques	14
b.1- les superoxydes dismutases.....	14
b.2- La catalase	15
b.3- Les ascorbates peroxydases.....	15
II.2.6- L'ajustement osmotique	16
II.2.6.1- La proline	17

II.2.6.2- Sucres et dérivés.....	18
II.2.7- Transduction du signal.....	19
II.2.7.1- Les kinases	19
II.2.7.2- Les phosphatases	20
II.2.7.3- Les phospholipides	20
II.2.7.4- Les ions Ca ²⁺	20
II.2.8- Les protéines des stress	21
II.2.8.1- Protéines heat-shock	21
II.2.8.2- Les protéines LEA	23
II.2.8.3- Aquaporines	24
II.2.8.4- Les protéases.....	25
III- Matériel et méthodes.....	26
III.1- Matériel végétal et application du stress hydrique.....	26
III.1.1- Systématique et botanique.....	26
III.1.2- Mise en germination des graines.....	27
III.1.3- Mise en culture et méthode d'arrosage.....	27
III.1.4- Application du stress.....	27
III.2 Méthodes.....	27
III.2.1- Détermination de la teneur relative en eau (TRE).....	27
III.2.2- Mesure de la longueur des plantules.....	27
III.2.3- L'intégrité membranaire.....	28
III.2.4- Etude biochimique.....	28
III.2.4.1- Détermination de la teneur en pigments foliaires.....	28
III.2.4.2- Extraction et dosage des protéines totales.....	28
III.2.4.3- Mesure des activités enzymatiques.....	29
a- Activité catalase totale (CAT).....	29
b- Activité soluble ascorbate peroxydase(APX).....	30
III.2.4.4- Séparation des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide monodimensionnel, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	30
III.2.4.5- Extraction et dosage de la proline.....	31
III.2.4.6- Extraction et dosage des sucres ethanolosolubles.....	32
III.2.4.7- Dosage des dérivés TBARS (Thiobarbiturie Acid Reactive Substances).....	33
III.3- analyse statistique.....	34
IV- Résultats, interprétations et discussions.....	36

IV.1- Effet du déficit hydrique sur la teneur relative en eau.....	37
IV.1.1- Résultats et interprétations.....	37
IV.1.2- Discussion.....	37
IV.2- Effet du stress sur la croissance linéaire de la partie aérienne.....	38
IV.2.1- Résultats et interprétations.....	38
IV.2.2-Discussion.....	39
IV.3- Effet du stress hydrique sur les teneurs en pigments photosynthétiques.....	40
IV.3.1- Résultats et interprétations.....	40
IV.3.1.1- Teneur en chlorophylles totales.....	40
IV.3.1.2- La teneur en caroténoïdes.....	40
IV.3.1.3- Le rapport chlorophylle a / chlorophylle b.....	41
IV.3.2-Discussion.....	42
IV.4- Effet du stress hydrique sur la teneur en sucres solubles.....	43
IV.4.1-Résultats et interprétations.....	43
IV.4.2-Discussion.....	44
IV.5- Effet du stress hydrique sur la teneur en proline.....	45
IV.5.1-Résultats et interprétations.....	45
IV.5.2-Discussion.....	46
IV.6- La teneur en protéines totales.....	47
IV.6.1-Résultats et interprétations.....	47
IV.6.2-Discussion.....	48
IV.7- L'intégrité membranaire.....	49
IV.7.1-Résultats et interprétations.....	49
IV.7.1.1- la fuite relative d'électrolytes.....	49
IV.7.1.2- Effet du stress hydrique sur la teneur en substances réactives à l'acide thiobarbiturique.....	50
IV.7.2-Discussion.....	51
IV.8- Effet du stress hydrique sur les activités enzymatiques.....	52
IV.8.1-Résultats et interprétations.....	52
IV.8.1.1- L'activité catalase.....	52
IV.8.1.2- L'activité de l'ascorbate peroxydase.....	53
IV.8.2-Discussion.....	54
IV.9- Effet du stress hydrique sur le profil électrophorétique des protéines des deux variétés.....	55

IV.9.1-Résultats et interprétations.....	55
IV.9.2- Discussion.....	56
V- Conclusion.....	58
VI- Références bibliographiques.....	61
Annexes	78

Introduction

I- Introduction

Les végétaux rencontrent fréquemment des variations de leur environnement. Dès lors que les facteurs externes sortent des conditions optimales de croissance de la plante, ils provoquent un stress qui a des effets sur la croissance, le développement et la productivité. Ces stress peuvent être provoqués par des organismes vivants (stress biotique) ou par des facteurs physiques ou chimiques de l'environnement (stress abiotique).

La sécheresse est un stress environnemental majeur pour les végétaux de tous les continents qui, en tant qu'organismes fixés, ne peuvent pas s'en soustraire. Par conséquent, c'est également un problème majeur pour l'homme puisque la sécheresse affecte grandement les rendements des cultures (Boyer, 1982).

La sécheresse est un syndrome complexe impliquant non seulement la privation de l'eau mais également la limitation nutritive et le stress oxydatif.

La réponse des plantes au déficit hydrique implique pratiquement tous les aspects de leur physiologie et de leur métabolisme (Zhu, 2001). Cette réponse va cependant dépendre de l'espèce végétale et de son génotype, de la durée et de l'intensité du déficit hydrique, de l'âge et du stade de développement de la plante, ainsi que des organes et des types cellulaires impliqués (Bray, 1997).

Le déficit en eau du sol provoque une diminution du potentiel hydrique de tous les organes de la plante, en particulier des feuilles, ce qui se traduit par un stress hyperosmotique. Celui-ci est caractérisé par une diminution de la pression de turgescence et une perte d'eau (Boudsocq et Laurière, 2005).

Lorsque le potentiel hydrique d'une plante diminue, l'accumulation de solutés provoque la baisse du potentiel osmotique et permet le maintien de la pression de turgescence des cellules. En effet, pour maintenir la balance de la force osmotique, les plantes accumulent un certain nombre d'osmotica. Les solutés accumulés sont de natures diverses: des ions (potassium), des sucres solubles (saccharose, glucose, fructose), des acides organiques (malate, pyruvate), des polyols (sorbitol, glycerol) et des composés du métabolisme *azoté* (amines, acides aminés libres). Leur contribution à l'osmolarité cellulaire dépend de leur nature et du taxon étudié (Morgan, 1992; Premachandra et Joly, 1992).

La fermeture des stomates, qui apparaît de manière très précoce face à un manque d'eau réduit le flux de CO₂ dans les feuilles. Ainsi, l'assimilation photosynthétique du carbone est diminuée en faveur de l'absorption d'oxygène photorespiratoire. Ces deux processus produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles l'ion superoxyde, l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) etc..... La production de superoxyde par la chaîne de transport photosynthétique d'électrons, par l'intermédiaire de la réaction de Mehler, est exacerbée par la sécheresse (Noctor *et al.*, 2002).

Pour contrecarrer leur toxicité, les cellules sont équipées en systèmes antioxydatifs fortement efficaces, qui renferment les enzymes du cycle ascorbate glutathion, la superoxyde dismutase (SOD), les peroxydases (POX) et la catalase (CAT) et des

molécules comprenant les caroténoïdes, l'alpha tocophérol, l'acide ascorbique, le glutathion et les composés phénoliques (Foyer et Noctor, 2000 ; Aroca *et al.*, 2003).

A l'échelle cellulaire, les mécanismes de protection mis en place sont caractérisés par un bouleversement de l'expression génique : la synthèse générale des protéines est nettement diminuée à l'exception d'une famille, les protéines de stress dont la synthèse est augmentée.

Il est actuellement admis que plusieurs critères physiologiques, biochimiques ou moléculaires peuvent être dégagés, à l'échelle de la cellule, ou de la plante entière, et utilisés dans un but de discrimination entre espèces ou variétés pour la résistance aux stress.

Le présent travail s'inscrit dans la thématique développée par l'équipe de physiologie végétale portant sur les : « Mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires de la tolérance des plantes aux conditions environnementales, aux pesticides et aux polluants: identification de marqueurs de tolérance ».

Au cours de ce travail, les effets du stress hydrique sur deux variétés de lentille (*Lens culinaris*) sont étudiés :

- Au niveau morphologique par la mesure de la croissance linéaire de la partie aérienne.
- Au niveau physiologique par le dosage de certains paramètres associés à la photosynthèse (sucres solubles et pigments photosynthétiques) ainsi que la mesure de la teneur relative en eau et les teneurs en proline et protéines totales.
- Au niveau des membranes cellulaires par le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique dont le malonyldialdéhyde et la mesure de la fuite relative des électrolytes.
- Au niveau du système de protection par la mesure des activités enzymatiques catalase et ascorbate peroxydase et la mise en évidence des protéines de stress par la technique d'électrophorèse SDS-PAGE.

*Synthèse
bibliographique*

II- Généralités

II.1- Description de *Lens culinaris* L.

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est la lentille *Lens culinaris* L (Adess en arabe, Lentille, Lentille alimentaire, Lentille comestible, Lentille cultivée en français et Lentil en anglais).

La lentille (*Lens culinaris* L.) appartient à la famille des légumineuses. C'est une plante annuelle de 20-40 cm de hauteur. Les feuilles à stipules entières, sont composées de 5-7 paires de folioles oblongues-obtuses qui se terminent en vrille simple ou bifurquée. Les fleurs sont fixées sur des pédoncules aristés égalant presque la feuille. Les fleurs sont d'un blanc bleuâtre de 5-7 mm de longueur avec un calice à dents égales, sétacées, la corolle est un peu plus courte que le calice. Le fruit est une gousse de 15 mm sur 8-10 mm, contenant 2 graines lenticulaires, jaunâtres ou brunes.

C'est au Moyen-Orient que l'on a commencé à cultiver la lentille, il y a environ 7 000 ans. Aujourd'hui, l'Inde, le Canada, la Turquie, l'Australie, le Népal, les États-Unis, le Bangladesh et la Chine sont les principaux producteurs mondiaux de cette culture. C'est une plante de saison fraîche au système racinaire limité qui affiche une tolérance modérée aux températures élevées et à la sécheresse. Elle ne tolère aucunement les sols gorgés d'eau, inondés ou à salinité élevée. La lentille est mieux adaptée aux zones tempérées fraîches. La graine est principalement consommée comme source de protéines dans divers produits allant des potages aux desserts. Renfermant 25 % de protéines, elle ne cède qu'au soja comme source de protéines assimilables. Excellente source de vitamine A, elle fournit de la fibre, du potassium, des vitamines B et du fer (Bulletin bimensuel canadien, 2000).

Les cinq premiers importateurs de lentilles sont le Sri Lanka, l'Égypte, l'Algérie, la Colombie et l'Espagne. Les principaux exportateurs sont notamment le Canada, l'Inde, l'Australie, la Turquie, les États-Unis et la Chine.

II.2- Stress et plante

Lorsque les facteurs externes sortent des conditions optimales de croissance de la plante, ils provoquent un stress. Ce stress peut être provoqué par des organismes vivants « stress biotique » ou bien par des excès physiques ou chimiques de l'environnement « stress abiotique ».

II.2.1- Les phases successives du stress

Selon Selye (1936), l'organisme sous les conditions stressantes passera par une succession de phases caractéristiques (Fig. 1).

II.2.1.1- La phase d'alarme : elle commence lorsqu'une contrainte survient au niveau cellulaire. Elle débute par la déstabilisation d'un certain nombre de structures (les membranes) et d'un certain nombre de fonctions (processus biochimiques et métabolismes énergétiques) indispensables pour la poursuite normale des activités vitales de la plante. Le catabolisme l'emporte sur l'anabolisme ; c'est la réaction fondamentale de stress.

Puis il y a une apparition rapide des processus de réparation et de restauration de l'état initial par la synthèse de molécules de protection ; c'est la réaction de restitution ou de récupération. Si le facteur de stress disparaît, il y a retour à l'état initial.

II.2.1.2- La phase de résistance : lorsque le facteur de stress continue ou bien s'intensifie, la plante accentue ses processus de protection avec apparition de certains nouveaux caractères. L'exposition graduelle au stress induit des modifications physiologiques et fait que la plante augmente sa résistance, survit, et continue à se reproduire au cours de la période de stress : c'est l'endurcissement. L'endurcissement est une acclimatation au stress et correspond à une étape de résistance maximale. Toutes modifications induites au cours de cette étape ne sont pas transmises aux générations suivantes, mais la plante les garde toute sa vie.

Si l'intensité du stress reste stable il y a passage à l'étape de l'ajustement ; au cours de cette étape, un haut degré de résistance est développé par la plante, alors s'ensuit un retour à une situation d'activité normale.

II.2.1.3- La phase d'épuisement : lorsque le stress continue, ou si l'intensité des facteurs du stress augmente, cette phase peut se mettre en place avec apparition de dommages irréversibles dus au facteur stressant lui-même, ou à l'attaque de prédateurs ou de parasites, menant ainsi à l'effondrement des fonctions de la plante.

La réponse au stress est donc une interaction entre l'effort de s'adapter et les processus potentiellement létaux dans le protoplasme. La contrainte, l'adaptation et la résistance sont des parties interconnectées de l'événement entier (Selye., 1936).

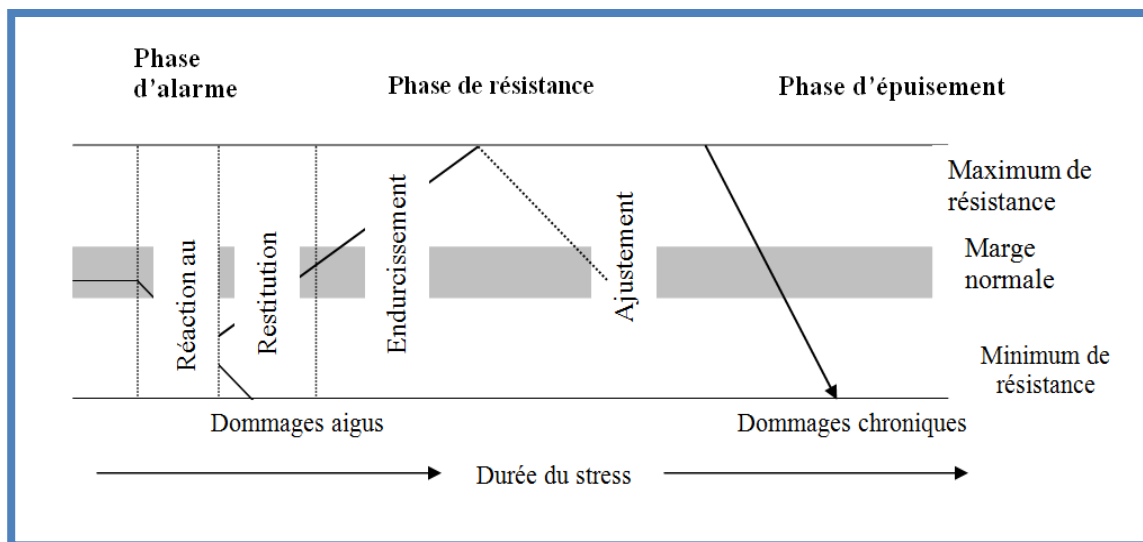


Figure 1 : Les phases successives d'un stress (d'après Selye, 1936,).

II.2.2-Le stress hydrique

Parmi les stress abiotiques, le stress hydrique édaphique peut se définir comme un déficit de disponibilité en eau pour la plante. L'origine de ce déficit peut provenir d'une sécheresse d'une salinité excessive du sol ou du gel qui par cristallisation des molécules d'eau diminue sa disponibilité. Néanmoins, un stress hydrique peut être provoqué aussi par un excès d'eau dans l'environnement de la plante.

Selon Kramer (1980), le stress hydrique est un concept physiologique, il s'agit d'une perturbation du fonctionnement physiologique normal de l'organisme. Le stress hydrique dépend donc à la fois de l'espèce et du processus physiologique considéré, ce qui le rend difficile à définir. Pour cette raison, Levitt (1972) préfère parler de contrainte hydrique qu'il définit comme le ratio du stress hydrique et de la résistance du processus physiologique considéré. Cette définition, qui nécessite de quantifier à la fois le stress et la résistance étant difficilement applicable, la définition de Kramer (1980) sera préférée dans cette étude.

Un stress hydrique provoque chez la plante toute une série de modifications histo-anatomiques, morphologiques, physiologiques et métaboliques (Passioura, 1982), telles l'orientation de la croissance vers la réduction du volume ou de la surface foliaire (Djebbar, 1991) un épaississement des feuilles limitant la transpiration (Vidal *et al.*, 1981 ; Delgado *et al.*, 1992). Le système racinaire devient plus important en vue d'une optimisation de l'apport en eau du sol (Huck *et al.*, 1983).

Une insuffisance en eau peut induire une réduction de la photosynthèse et de la transpiration liée à la diminution du potentiel hydrique (Bensari, 1989 ; Djebbar, 1991) et à la fermeture des stomates (Schulze, 1986 ; Bensari, 1989).

Un stress hydrique sévère est accompagné d'une diminution de la quantité du CO₂ fixé, cette diminution est due non seulement à la fermeture des stomates mais aussi à la réduction de l'activité de la ribulose 1-5 diphosphate carboxylase (Castrillo et Trujillo, 1992).

L'acide abscissique est l'hormone principale permettant de réguler la tolérance à ces stress. Un de ses rôles principaux est de maintenir l'homéostasie osmotique des cellules, grâce à la fermeture des stomates et à l'induction de gènes de la tolérance au stress hydrique (Henson, 1984 ; Mohopatra *et al.*, 1988 ; Creelman *et al.*, 1990).

Au niveau cellulaire, un déficit hydrique provoque la perte de la turgescence cellulaire (Skiver et Mundy, 1990). Une accumulation de composés à faible poids moléculaire peut contribuer à l'ajustement osmotique pour le maintien de la turgescence cellulaire.

II.2.3- Le statut hydrique de la plante

Le statut de l'eau dans la plante est déterminé par deux notions selon les auteurs.

II.2.3.1- La teneur relative en eau : TRE ou RWC (relative water content)

Cette notion a été proposée par Clark et McCaig (1982), Schonfeld *et al.* (1988) et Matin *et al.* (1989) ; elle consiste à déterminer en pourcentage la quantité d'eau présente dans les feuilles. Elle permet d'estimer le statut de l'eau de la plante, et en particulier le déficit hydrique. Sa mesure nécessite peu de moyens dans l'ensemble. La teneur relative en eau est

fortement liée à l'environnement c'est à dire que la variation de la quantité de l'eau dans le milieu influe sur la quantité de l'eau dans les plantes. Une TRE élevée permet le maintien de la turgescence cellulaire chez ces plantes, ce qui permet l'ouverture des stomates ; l'assimilation du carbone et donc une bonne activité photosynthétique, ainsi que l'élongation cellulaire (Meyer et Grenn, 1981).

II.2.3.2- Le potentiel hydrique foliaire : ou potentiel chimique Ψ .

Cette notion a été proposée par Roy (1980) et a été appuyée par Katerji et Cruiziat (1985) et Kramer (1983). Ces auteurs pensent qu'il est préférable d'utiliser le potentiel hydrique foliaire du fait que les valeurs des potentiels hydriques du sol et de la plante régissent les flux hydriques du continuum sol-plante-atmosphère et agissent de plus sur la plupart des processus intervenant dans la croissance le développement et la reproduction. Le potentiel hydrique fournit une description thermodynamique de l'eau dans la plante et il constitue une force motrice du mouvement de l'eau. Le potentiel hydrique cellulaire est inférieur à celui de l'eau pure, donc, sa valeur algébrique est négative. Il peut être exprimé par unités de pression : Pa, Atm, Bar.

Les composantes du potentiel hydrique peuvent être résumées par l'équation suivante :

$$\Psi = \Pi_s + \Pi_m + P$$

Π_s : Potentiel osmotique.

Π_m : Potentiel matriciel.

P : Potentiel de turgescence de la cellule.

Le potentiel osmotique (Π_s) mesure l'énergie de rétention de l'eau cellulaire par les substances solubles (ions, sucres, acides organiques et aminés..).

Le potentiel matriciel (Π_m) dépend des forces de rétention de l'eau dans les microcapillarités des parois cellulaires et des substances hydrophiles du cytoplasme.

Le potentiel de turgescence (P) mesure la force des pressions exercées par la vacuole par l'intermédiaire du cytoplasme sur la paroi.

Pour maintenir un flux d'eau du sol vers les racines, la plante doit maintenir le potentiel hydrique des racines inférieur à celui du sol. Dans le cas contraire, il y a perte de turgescence et la plante perdra de l'eau. En situation de stress hydrique, le potentiel hydrique du sol s'abaisse, la plante doit alors répondre en abaissant également le potentiel hydrique des racines et peut pour cela, diminuer la pression mécanique exercée par les parois (début de plasmolyse) ou moduler la pression osmotique en augmentant l'osmolarité de la solution cellulaire par accumulation de solutés ou osmoticum, ce mécanisme est appelé osmorégulation.

II.2.4- Les stratégies de réponses

Les réponses de la plante sont multiples et si certaines sont spécifiques d'un stress, d'autres sont des réponses communes aux agressions extérieures.

Chaque espèce va répondre au stress par des stratégies de résistance différentes lui permettant de survivre. Chaves *et al.* (2003) détaillent les mécanismes de résistance à la sécheresse. Ils sont groupés en trois catégories même si ces mécanismes ne sont pas exclusifs et qu'une plante combine toute une gamme de types de réponses:

a- L'échappement (ou évasion): concerne les espèces capables d'accomplir leur cycle de vie avant que le déficit physiologique en eau n'intervienne. C'est la stratégie adaptée par les plantes des régions arides effectuant leur cycle reproductif après une pluie et dont les graines supportent de longues périodes de sécheresse. Cette stratégie ne s'applique pas aux plantes pérennes comme les arbres.

b- L'évitement : consiste à maintenir le potentiel hydrique et à limiter au maximum les pertes d'eau par transpiration pour se prémunir de l'exposition au stress. Certaines plantes ferment très rapidement leurs stomates, d'autres limitent la masse foliaire, présentent des feuilles modifiées ou conservent les feuilles âgées pour se protéger du rayonnement solaire. Les feuilles sont aussi parfois munies de cuticules épaisses. Une allocation du carbone privilégiant un système racinaire profond et développé permet également d'optimiser l'accès aux ressources en eau.

c- Les plantes tolérantes mettent en œuvre des mécanismes leur permettant de supporter le stress. En diminuant le potentiel hydrique elles maintiennent la turgescence par l'ajustement du potentiel osmotique, obtenu par accumulation d'ions minéraux et/ou de composés organiques.

Les espèces ne présentent pas toutes la même plasticité de réponse au stress. Certaines caractéristiques sont déterminées génétiquement qu'il y ait présence du stress ou non, comme un système racinaire profond, un système foliaire constitué d'aiguilles ou un fonctionnement photosynthétique du type CAM. La résistance d'une plante à un stress sera une combinaison des caractères constitutifs de l'espèce et de sa plasticité propre. Une plante pourra donc être considérée comme appartenant à une espèce évitante (ex : morphologie constitutive) mais d'une variété tolérante (ex : capacité induite d'ajustement du potentiel osmotique).

II.2.5- Les conséquences du stress hydrique

II.2.5.1- Limitations de la croissance des organes de la plante

Les réductions de croissance sont l'une des premières manifestations du déficit hydrique (Kramer et Boyer, 1995 ; Saab et Sharp, 2004). Elles se produisent soit directement au travers d'une réduction de vitesse de croissance, soit indirectement en réduisant le nombre d'organes (feuilles). La limitation de la croissance foliaire est un mécanisme adaptatif qui permet de réduire la transpiration.

- *La réduction de vitesse de croissance foliaire met en jeu plusieurs mécanismes :* La vitesse de division cellulaire décroît (Granier *et al.*, 2000), les parois cellulaires, qui doivent se déformer pour permettre la croissance cellulaire, deviennent plus rigides (Cosgrove, 2005), la turgescence décroît (Bouchabke *et al.*, 2006). Chacun de ces phénomènes met en jeu plusieurs familles de gènes dont les régulations ne sont qu'imparfaitement connues (Kiani *et al.*, 2007).

- *L'architecture de la plante est profondément modifiée* : Un déficit hydrique, même très modéré et ne présentant pas de symptômes flagrants, se traduit chez beaucoup d'espèces par une modification importante de l'architecture de la plante. Chez la vigne le nombre de ramifications et le nombre d'organes élémentaires (phytomères) de la tige sont drastiquement réduits (Lecoœur *et al.*, 1995 ; Belaygue *et al.*, 1996 ; Lebon *et al.*, 2004). Chez les graminées, le nombre de talles est réduit en cas de déficit hydrique (Courtois *et al.*, 2000).

Les racines sont les organes dont la croissance est la moins affectée, par rapport aux parties aériennes, végétatives et reproductrices (Soar et Loveys, 2007). La régulation des gènes affectant la croissance est assez nettement différente chez les racines et les parties aériennes (Wu et Cosgrove, 2000).

II.2.5.2- Effet du stress hydrique sur la photosynthèse

Lors d'un déficit hydrique, l'activité physiologique de la feuille, et plus particulièrement la photosynthèse et la conductance stomatique sont affectées (Lowlor, 2002 ; Lowlor et Cornic, 2002). La réduction de la photosynthèse, liée à la diminution du potentiel hydrique foliaire, est supposée dépendre à la fois :

- ✓ de la fermeture des stomates, avec pour conséquence une diminution de la conductance à la diffusion du CO₂.
- ✓ d'une limitation biochimique du chloroplaste à fixer le CO₂ (Graam et Boyer 1990), probablement associée à la régénération limitante du Ribulose Biphosphate, substrat du cycle de Calvin (Gimenez *et al.*, 1992).

La conductance stomatique diminue lors de l'abaissement du potentiel hydrique. Le contrôle de la régulation stomatique fait intervenir la turgescence cellulaire mais également des messagers racinaires, comme l'acide abscissique (ABA) (Davis *et al.*, 1994 ; Sauter *et al.*, 2001).

La turgescence cellulaire intervient quant à elle de manière plus ou moins directe au niveau du chloroplaste : directement par le maintien du volume du chloroplaste (Gupta et Berkowitz, 1987), et indirectement, par son effet sur l'ouverture stomatique, qui en contrôlant la conductance au CO₂, conditionne l'utilisation de l'énergie photochimique (ATP, NADPH) dans le chloroplaste. La non-utilisation de cette énergie peut induire ou exacerber des phénomènes de photo-inhibition. Ceux-ci se traduisent par la diminution, plus ou moins rapidement réversible, du potentiel photochimique, liée à l'activation des mécanismes de dissipation de l'énergie, et/ou à la destruction proprement dite des photosystèmes II (PSIIs).

II.2.5.3- Le stress oxydatif

Une conséquence des stress environnementaux, comprenant le stress hydrique, est l'apparition d'un stress oxydatif, c'est-à-dire l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène ou ("reactive oxygen species", ROS), qui endommagent les structures cellulaires (Appel et Hirt, 2004). Dans des conditions optimales, les feuilles sont dotées d'enzymes et de métabolites antioxydants suffisants pour faire face aux ROS. De nombreux travaux montrent que des enzymes telles que des superoxide dismutases (SOD), des ascorbate peroxydases (APX), des catalases (CAT) et des glutathion peroxydases (GPX) s'accumulent pendant le stress hydrique (Flexas *et al.*, 2006). La capacité du système antioxydant est déterminante pour maintenir l'intégrité du système photosynthétique lors d'une contrainte hydrique.

Le terme "espèces réactives de l'oxygène" désigne les radicaux libres de l'oxygène (oxygène singulet, $^1\text{O}_2$, radicaux superoxyde, $\cdot\text{O}_2$ radicaux hydroxyl, $\cdot\text{OH}$, monoxyde d'azote $\text{NO}\cdot$, ...). Il désigne aussi certains dérivés oxygénés réactifs non-radicalaires de toxicité importante (principalement le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , qui se décompose en deux radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques comportant un électron périphérique non apparié. L'atome ou la molécule est alors instable, très réactive et cherche à acquérir un autre électron ou à transférer l'électron célibataire vers une autre molécule. Si son instabilité est faible, le radical libre correspond à une étape intermédiaire d'une réaction d'oxydoréduction classique et est sans conséquence. Mais lorsque son instabilité est importante, il devient un composé très réactif et peut céder son électron surnuméraire à toute molécule se trouvant à proximité. Les radicaux libres se caractérisent alors par leur très forte réactivité et une espérance de vie courte.

II.2.5.3.1- Les sites de formation des ROS

Chez la cellule animale, la mitochondrie est le site majeur de la production des ROS. Contrairement aux cellules végétales pour lesquelles la production des ROS est majoritairement liée aux activités photosynthétique et photorespiratoire. Le flux d'électrons à travers la chaîne photosynthétique excède de plus de 10 fois de celui de la mitochondrie et la production de superoxyde par les mitochondries est vraisemblablement nettement plus faible que celle du chloroplaste (Foyer et Noctor, 2003) (fig. 2).

Chloroplaste

Les ROS sont principalement formés au niveau du PSII (LHCII et du centre réactionnel) et du côté accepteur de PSII. Pour le PSII, ce sont les chlorophylles qui peuvent être une source de ROS. En effet, un transfert d'énergie entre la chlorophylle à l'état triplet (^3Chl) et l'oxygène au niveau du PSII produit l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Pour le PSI, c'est au niveau de la ferrédoxine/NADP⁺ oxydoréductase que l' O_2 est réduit en O_2^- (ion superoxyde) (Niyogi, 1999; Wise, 1995). Enfin, la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la voie de détoxification fait apparaître des oxydants et réducteurs forts comme : $\text{HO}\cdot$ (radical hydroxyl), MDHA (monodéhydroascorbate), DHA (déhydroascorbate) et GSSG (glutathion oxydé) (Wise, 1995) (fig. 2).

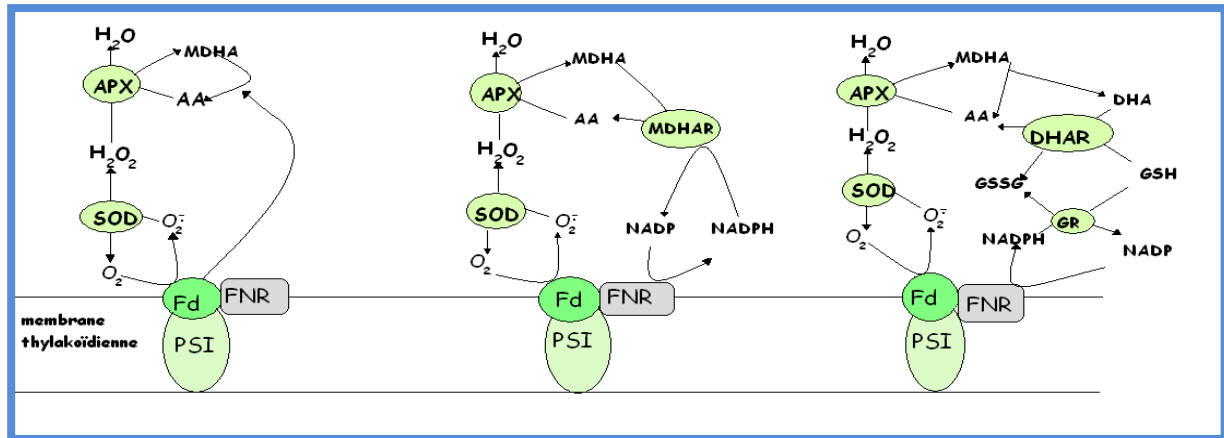


Figure 2: la production des radicaux libres et leur détoxification au niveau de la chaîne photosynthétique. PX: ascorbate peroxydase ; AA/DHA:formes réduite/oxydée de l'ascorbate; DHAR:déshydroascorbate réductase; DHA:déshydroascorbate; Fd:ferrédoxune; FNR:ferrédoxine:NADP oxydoreductase ; GR glutathion réductase ; GSH/GSSG:forme réduite/oxydée du glutathion ; MDHA : monodéshydroascorbate ; MDHAR: monodéshydroascorbate reductase ; PSI photosysteme I (Foyer et Noctor, 2000).

Le peroxysome

Au niveau du peroxysome, l' H_2O_2 est principalement généré par la photorespiration, la β -oxydation des acides gras, les flavines oxydases. Lors de la photorespiration, l' H_2O_2 est produit en grande quantité par la glycolate oxydase. Il existe également dans la membrane peroxysmale un site de production d' O_2^- NADPH-dépendant, qui est apparemment formé par une petite chaîne de transfert d'électrons utilisant l' O_2 comme accepteur, avec la production cytosolique d' O_2^- . Le peroxysome est également le site de production de l'oxyde nitrique : le NO produit par la NO synthase, peut réagir avec le radical O_2^- pour former un radical dangereux, le peroxynitrite (Corpas *et al.*, 2001).

La mitochondrie

Chez les plantes, seule une petite partie de l' O_2 consommé par les mitochondries est à l'origine des ROS. Cette production des ROS peut être augmentée quand la respiration est limitée par un manque d'ADP, condition qui favorise la génération de l'ubisemiquinone, qui est capable de réduire directement l' O_2 en O_2^- (Boverris *et al.*, 1976). Chez les plantes, les complexes I et III sont considérés comme étant les sites principaux de formation des ROS, dans la mitochondrie (Møller, 2001).

La membrane plasmique

La NAD(P)H oxydase liée a la membrane plasmique est activée lors d'un stress, et produit donc une grande production de O_2^- qui est converti par la suite en H_2O_2 (Lamb et Dixon, 1997, Mittler *et al.*, 1999).

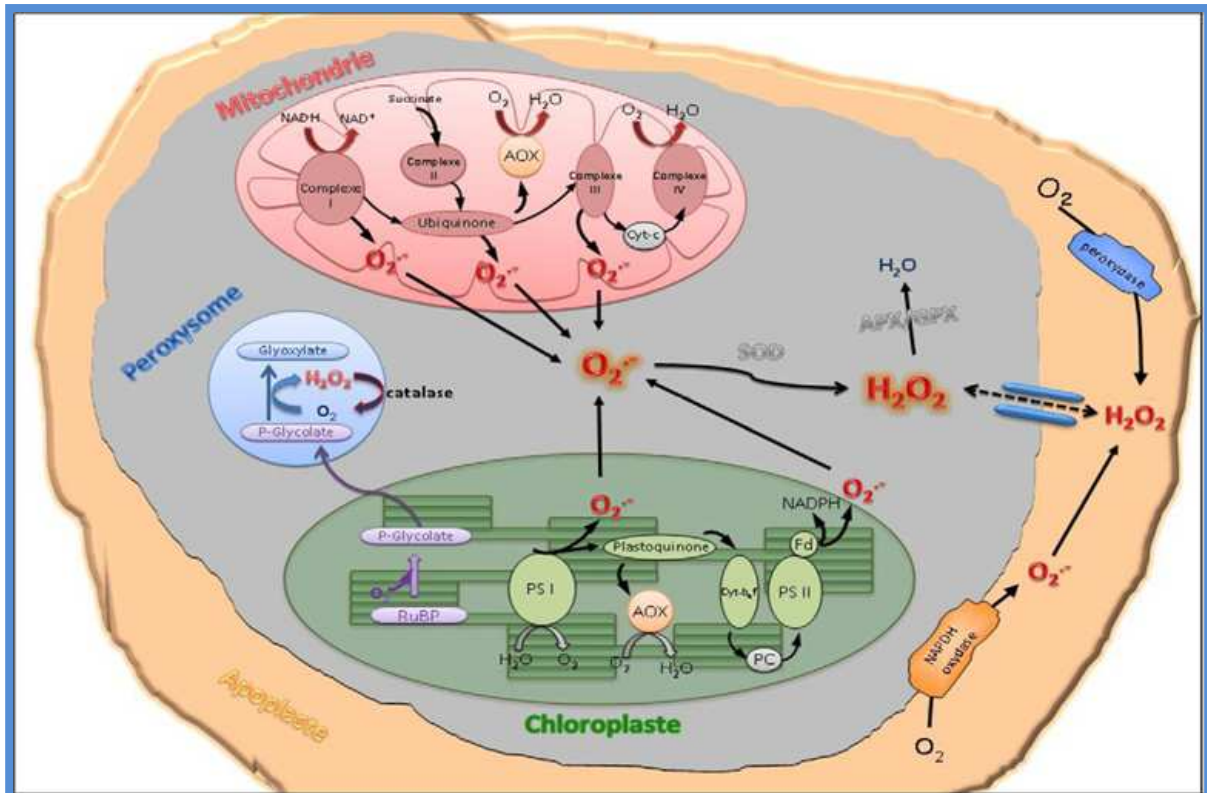


Figure 3 : Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale (Parent *et al.*, 2008).

II.2.5.3.2- L'effet des espèces actives d'oxygène sur les compartiments cellulaires

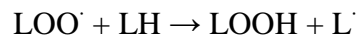
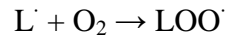
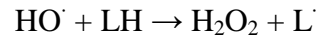
Le danger des ROS vient de leur très forte réactivité qui entraîne des phénomènes d'oxydation en chaîne. Ils sont incriminés dans la désactivation de certaines enzymes (H₂O₂ est responsable de l'inhibition de certaines enzymes du cycle de Calvin) et dans l'attaque de certains composants cellulaires (Appel et Hirt, 2004). Ils interagissent avec les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. Ils peuvent aussi acquérir de l'hydrogène de nombreuses molécules biologiques, comme les thiols (R-SH) pour former des radicaux soufrés toxiques. Mais surtout, les radicaux libres sont connus pour réagir avec les membranes jusqu'à entraîner leur destruction. Ils sont en particulier à l'origine de la peroxydation des lipides membranaires qui entraîne la production de peroxydes et d'hydroperoxydes lipidiques et *in fine* la formation d'OH. Ces derniers, formés à proximité des membranes, peuvent à leur tour attaquer les chaînes d'acides gras.

Péroxydation des lipides

Lors d'un stress oxydatif, les acides gras polyinsaturés des membranes sont facilement peroxydés.

La peroxydation des lipides se fait en trois étapes distinctes : l'initiation, la propagation et la terminaison. La réaction d'initiation entre un acide gras polyinsaturé (LH) et le radical hydroxyl (R[•]) conduit à une déshydrogénation de l'acide gras formant ainsi un nouveau radical libre carboné possédant un électron libre (L[•]). La réaction de propagation permet

ensuite à l'oxygène moléculaire de réagir avec le radical précédent pour former le radical peroxyde (LOO·). Ce dernier arrache à son tour un atome d'hydrogène à un nouvel acide gras pour former un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical d'acide gras qui s'oxyde à son tour, assurant la propagation de la réaction.



Les hydroperoxydes étant relativement instables, ils peuvent en présence de fer, participer à la réaction de Fenton et entraîner la formation du radical hydroxyl (OH·).

La réaction de peroxydation se termine lorsque deux radicaux lipidiques se rencontrent, ou lorsque le radical lipidique interagit avec un antioxydant liposoluble tel que l'α tocophérol (-TOH) (fig. 4).

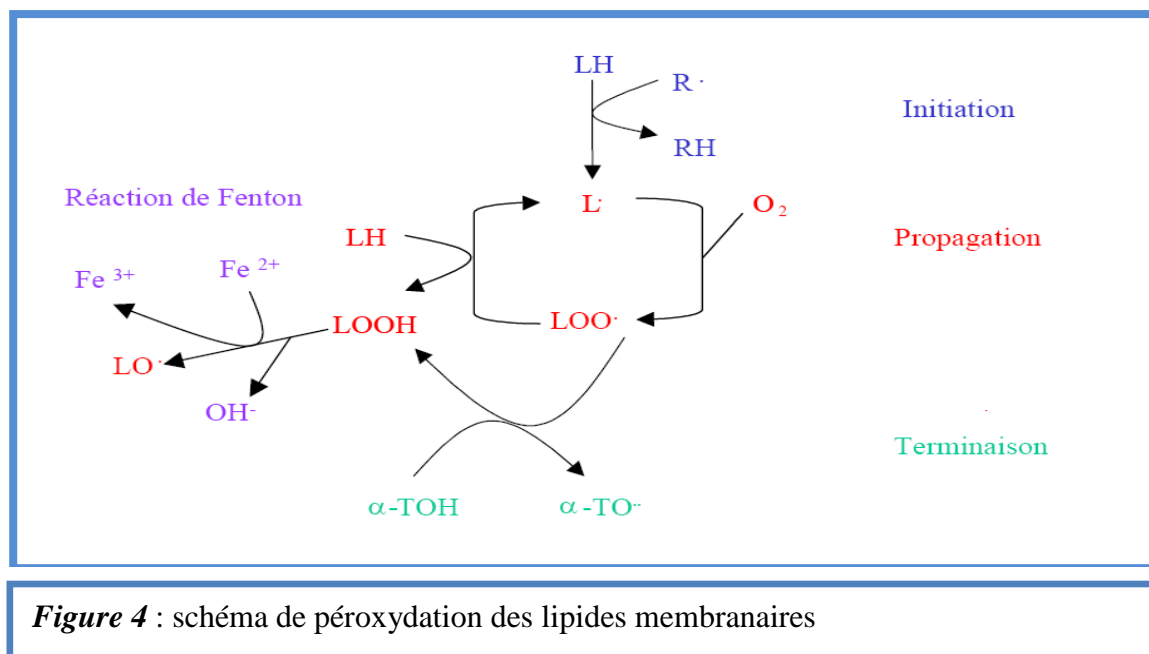


Figure 4 : schéma de peroxydation des lipides membranaires

Le MDA libre connu comme produit majeur de la peroxydation des lipides est considéré comme un marqueur de stress oxydatif chez de nombreuses plantes stressées. Le MDA, en s'attachant aux autres molécules cellulaires provoque des dommages au niveau de la plante : il entraîne des perturbations de la micro-architecture des membranes, altère leur perméabilité et peut réagir avec les fonctions amines ou thiols des protéines ainsi qu'avec les molécules d'ADN.

II.2.5.3.3- Les systèmes de détoxification

Le système antioxydant détruit les ROS afin de préserver l'intégrité de la cellule. Ce système fait intervenir des molécules enzymatiques et non enzymatiques qui ne sont pas réparties de façon uniforme dans la cellule (Bray *et al.*, 2000).

a- Le système non enzymatique

Le terme antioxydant décrit un composé capable de détruire les ROS sans suivre lui-même de conversion en radical libre destructif. Parmi les antioxydants non enzymatiques on trouve la vitamine E, la vitamine C, les flavonoïdes, le β -carotène. Les caroténoïdes sont impliqués dans ce mécanisme via le cycle des xanthophylles (Munné-Bosch et Alegre, 2000). Les tocophérols protègent les membranes des chloroplastes, des mitochondries et des peroxysomes. Les deux principaux antioxydants dans la phase soluble sont l'ascorbate et le glutathion. Ils sont impliqués dans un cycle enzymatique, dit cycle ascorbate/glutathion, qui permet leur régénération quand ceux-ci sont oxydés. Ils sont présents dans tous les compartiments cellulaires (Foyer et Halliwell, 1976).

✓ Vitamine E : l' α -tocophérol est une molécule liposoluble, son activité antioxydante comprend : la protonation des radicaux peroxydes et alcoxydes des acides gras membranaires, permettant ainsi la terminaison du mécanisme de peroxydation des lipides; la vitamine E intervient aussi dans la réduction des radicaux libres carbonyles et oxydes d'acides aminés, préservant ainsi la structure des protéines membranaires.

✓ L'acide ascorbique, ou vitamine C: une molécule hydrosoluble ayant à la fois un rôle pro-oxydant et antioxydant. Son activité antioxydante est comparable à celui de l' α -tocophérol au niveau des compartiments hydrophiles de la cellule. Il est capable de réduire l'anion superoxyde ainsi que les radicaux hydroxydes, perhydroxydes et peroxydes.

✓ Caroténoïdes : en plus de leur rôles en tant que pigments accessoires dans la collecte de l'énergie lumineuse, ils interviennent en tant qu'antioxydants ; leur action antioxydante repose sur leur capacité à piéger l'oxygène singulet (Young et Britton, 1990) et à neutraliser les radicaux peroxydes. Ces pigments liposolubles (principalement β - carotènes) participent également à la prévention de la production de ROS, soit par la désactivation des chlorophylles triplet, soit par la dissipation de l'excès énergétique au travers du cycle des xanthophylles (Demmig-Adams et Adams, 1993).

✓ Glutathion stocké dans la cellule, il participe à la détoxification des peroxysomes en partenariat avec la Glutathion Peroxydase. De plus, il possède une forte affinité pour les éléments électrophiles. Ainsi le GSH se fixe sur les groupements réactifs grâce à la Glutathion S-transférase et les neutralise. Les molécules devenues inoffensives sont ensuite éliminées. De même, le GSH peut se fixer sur des groupements thiols oxydés des protéines pour les neutraliser en attendant la renaturation de la protéine (Hayes et McLellan. ; 1999).

✓ Flavonoïdes : ils sont issus du métabolisme secondaire et ont également un important effet antioxydant : la désactivation de l'oxygène singulet, qui est dû à leur structure phénolique (Tournaire *et al.*, 1993 ; Benov et Georgiev, 1994), le scavenging de H_2O_2 et OH^\cdot (Gould *et al.*, 2002). Ces composés protègent également les plantes des radiations UV et dégradent les ROS générés par ces radiations

✓ Différentes fonctions physiologiques sont attribuées aux polyols tels que le mannitol: des études *in vivo* (Shen *et al.*, 1997) et *in vitro* (Smirnoff et Cumbes, 1989) ont montré le pouvoir de piègeur de ces polyols. De plus, des études récentes sur le polyol galactinol et le sucre raffinose ont révélé leur rôle dans la protection des plantes contre les dommages générés par les ROS. En effet, une augmentation intracellulaire de ces deux composés chez des plantes transgéniques a pu être corrélée à une augmentation de tolérance au traitement par le méthylviologène (ou paraquat), qui génère du superoxyde, ainsi qu'au stress salin et au froid (Nishizawa *et al.*, 2008).

Le cycle ascorbate/glutathion

Le principal système de détoxification des ROS dans les chloroplastes est le cycle de l'ascorbate/glutathion. Au cours de ce cycle, le déshydroascorbate (DHA) réagit avec le glutathion sous forme réduite (GSH) pour produire de l'ascorbate et du glutathion sous forme oxydée (GSSG). L'ascorbate est alors oxydé par H_2O_2 et redonne du DHA, alors que le GSH est régénéré à partir du GSSG en présence de NADPH et H^+ .

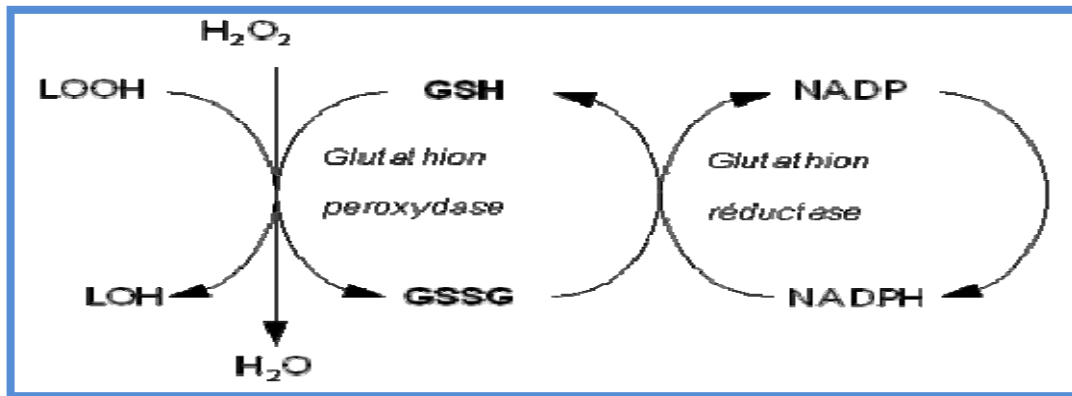


Figure 5 : Cycle du glutathion (Rousseau, 1999)

b- Les systèmes enzymatiques

Les principaux acteurs de cette détoxification sont les superoxydes dismutases (SOD), les ascorbate peroxydases (APX), les catalases (CAT), les monodehydroascorbate réductases (MDAR), les dehydroascorbate réductases (DHAR) et les glutathion réductases (GR) (Iba, 2002).

b.1- les superoxydes dismutases

Les superoxyde-dismutases (SOD) sont des métalloprotéines qui jouent un rôle important dans la défense contre les ROS. Elles éliminent, par une réaction de dismutation, l'ion superoxyde (O_2^-), formant à partir de deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène.

Les plantes possèdent de nombreuses isoformes de SOD. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au coeur de l'enzyme ; sa nature permet de différencier trois groupes d'enzymes : la MnSOD majoritairement présente dans les mitochondries et les peroxysomes, mais également dans le cytosol, la Cu/ZnSOD présente dans le cytosol, ainsi que dans les mitochondries et les chloroplastes et la FeSOD localisée dans le cytosol, les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes (Alscher *et al.*, 2002).

De nombreuses études utilisent aujourd'hui des plantes transgéniques ou des clones surexprimant des ADNc de SOD (Bowler *et al.*, 1991; Perl *et al.*, 1993) et présentant une augmentation de l'activité enzymatique correspondante. Certaines de ces expérimentations ont abouti à une amélioration de la tolérance au stress oxydatif (Bowler *et al.*, 1991; Perl *et al.*, 1993).

b.2- La catalase

La catalase (CAT) est une enzyme importante dans la protection face au stress oxydant chez tous les organismes aérobies. Elle catalyse, de façon extrêmement rapide, la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, protégeant ainsi les cellules des effets oxydant causés par une augmentation de H₂O₂.

De nombreuses isozymes de CAT sont retrouvées chez les plantes, il existe trois types de catalases, qui sont très similaires dans la séquence de leur gène, mais qui sont impliquées dans des processus cellulaires distincts (Willekens *et al.*, 1994). La première classe comprend les gènes fortement exprimés dans les feuilles, dépendants de la lumière et impliqués dans la détoxification du H₂O₂ produit durant le processus de photorespiration.

Les catalases appartenant à la deuxième classe sont distribuées dans la plante entière, avec une préférence pour les tissus vasculaires. C'est le cas des catalases codées par *CAT1* chez *Arabidopsis thaliana* (Frugoli *et al.*, 1996) ou *CAT2* chez *Nicotiana plumbaginifolia* (Suzuki *et al.*, 1995). Enfin la troisième classe est abondante dans les graines et les plantules, suggérant son implication dans l'élimination du H₂O₂ des glyoxysomes (Willekens *et al.*, 1994). C'est le cas de la catalase codée par *CAT3* chez *Arabidopsis thaliana* (Frugoli *et al.*, 1996).

L'augmentation des ROS, en réponse à des stress biotiques et abiotiques chez des plantes transgéniques privées de catalase, a révélé l'importance de ces enzymes dans la tolérance des plantes au stress oxydant (Willekens *et al.*, 1997). Néanmoins, la réponse des différentes isozymes semble être variable en fonction des types de stress.

b.3- Les ascorbates peroxydases

L'ascorbate peroxydase (APX) joue un rôle important dans le métabolisme du peroxyde d'hydrogène chez les végétaux supérieurs (Shigeoka *et al.*, 2002) ; elle fait partie du cycle de Halliwell-Asada, ou cycle de l'ascorbate-glutathion, système de défense très efficace pour limiter les ROS qui conduit à la dégradation du H₂O₂ en H₂O et en O₂ sans production secondaire d'un autre ROS. Bien que ce cycle ait été bien étudié dans les chloroplastes, il est également présent dans le cytoplasme, les peroxysomes et les mitochondries (Foyer et Halliwell, 1976; Asada et Takahashi, 1987).

La première identification des APX s'est faite dans les chloroplastes intacts isolés et les algues (Gordon et Beck, 1979; Shigeoka *et al.*, 1980; Nakano et Asada, 1981). Dans les chloroplastes, les APX ont au moins trois formes différentes: APX thylacoïdes qui sont liées à la membrane des thylacoïdes, et APXS stromales et lumbinales qui sont présentes en tant qu'isoformes solubles (Asada, 1999; Shigeoka *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004).

Mittler (2002) décrit l'APX comme un modulateur du niveau de l'H₂O₂ dans la cellule (les catalases étant les enzymes mises en jeu en cas de fortes concentrations en H₂O₂).

La fonction d'APX est dépendante de la disponibilité en acide ascorbique réduit (Fig 6), et dans certains cas, en glutathion réduit (Polle, 2001).

L'ascorbate peroxydase pourrait donc fonctionner comme une partie du système d'enlèvement de H₂O₂ des plantes permettant de contrôler le niveau de l'état stationnaire de H₂O₂ utilisé pour la signalisation cellulaire au cours du stress biotique ou abiotique.

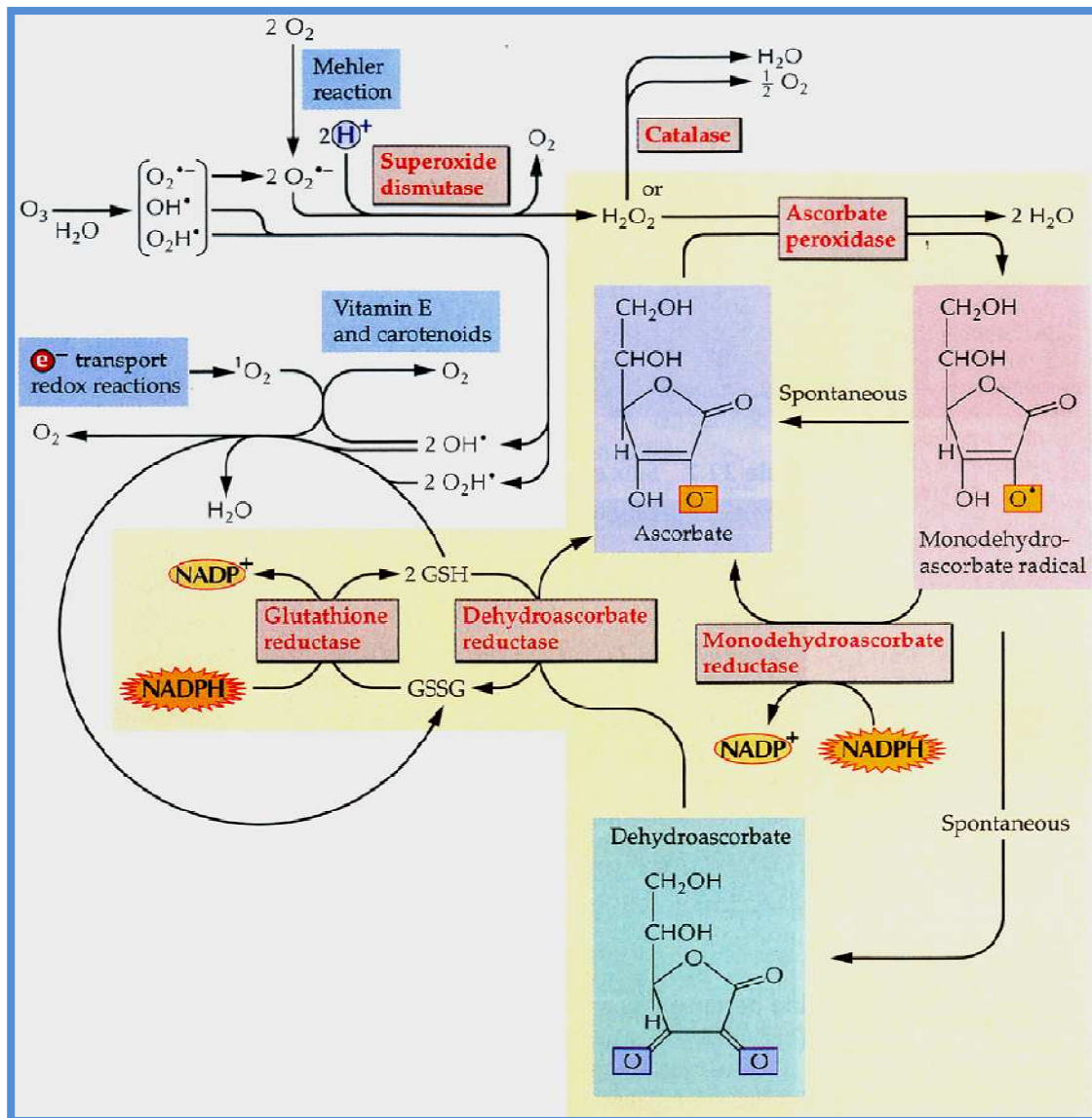


Figure 6 : Schéma des principales voies de détoxification des ROS (Reactive oxygen species) (Bray *et al.*, 2000)

II.2.6- L'ajustement osmotique

Lors d'une déshydratation, le maintien du potentiel hydrique s'exprime par un maintien de la turgescence cellulaire, rendu possible grâce à l'ajustement osmotique (Ramanjulu et Bartels, 2002) qui est un paramètre essentiel de la résistance au stress. Les solutés accumulés ont un poids moléculaire faible, un pH neutre, sont non toxiques, chimiquement divers, très solubles dans l'eau et n'interfèrent pas avec le métabolisme cellulaire (Ramanjulu et Bartels, 2002). Ces solutés sont appelés osmolytes ou solutés compatibles (Serraja et Sinclair, 2002). Les osmolytes incluent des ions (K⁺ par exemple), des sucres solubles ou des acides aminés (notamment la proline et la glycine bêtaïne) (Serraja et Sinclair, 2002).

Plusieurs exemples montrent une modification de l'expression des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse d'osmolytes en réponse au déficit hydrique. Par exemple, l'expression

simultanée du gène de la δ 1pyrroline-5 carboxylate synthétase (P-5-CS) et la répression du gène de la proline déshydrogénase (ProDH) conduit à une accumulation de proline pendant le déficit hydrique (Yoshida *et al.*, 1997). Un transporteur (Le ProT1) de la proline a été également induit par le stress hydrique (Schwacke *et al.*, 1999). Ceci illustre la complexité du métabolisme permettant l'ajustement du niveau de proline.

L'accumulation des osmolytes est accompagnée par une réduction de l'efflux de l'eau des cellules (Ramanjulu et Bartels, 2002) pour le maintien de la croissance et du métabolisme cellulaire. En permettant au cytosol d'accomplir un équilibre osmotique avec la vacuole, ces solutés compatibles protègent les membranes cellulaires, les protéines et la machinerie métabolique des dommages résultant de la déshydratation (Rathinasabapathi, 2000).

Les osmolytes peuvent contribuer à l'ajustement osmotique, mais également être impliqués dans d'autres mécanismes vis à vis du déficit hydrique, comme la détoxification des ROS (Hong *et al.*, 2000).

II.2.6.1- La proline

La proline est un acide aminé cyclique à pH neutre, non toxique pour la plante. C'est un des solutés les plus stables et le plus distribué chez les plantes (Bonhert *et al.*, 1998).

L'accumulation de la proline, induite par les stress, peut être le résultat de trois processus complémentaires : stimulation de sa synthèse (Morris *et al.*, 1969 ; Boggess *et al.*, 1976), inhibition de son oxydation (Stewart *et al.*, 1977 ; Rayapati et Stewart, 1991) et/ou altération de la biosynthèse des protéines (Stewart *et al.*, 1977).

Le glutamate et l'ornitine sont des précurseurs de la proline. La proline est formée à partir du glutamate via 2 intermédiaires, Glutamic semialdehyde (GSA) et δ -1pyrroline-5-carboxylate (P5C), réaction catalysée par 2 enzymes P5C synthase (P5CS) en première étape et P5C réductase (P5CR) pour la dernière étape. Une surproduction de la proline a été observée chez des plantes transgéniques pour la δ 1pyrroline-5 carboxylate synthétase (P5CS) telles le tabac (Kavi Kishor *et al.*, 1995), le riz (Zhu *et al.*, 1998) et le blé (Sawahel et Hassan, 2002) lors d'un stress hydrique et salin. Des travaux réalisés chez le soja (De Ronde *et al.*, 2000) et *Arabidopsis* (Nanjo *et al.*, 1999a) transgénique pour le gène δ -1 pyrroline-5-carboxylate réductase et le gène codant pour la proline dehydrogenase (ProDH) (Nanjo *et al.*, 1999b) ont montré que l'accumulation de la proline est positivement corrélée avec la tolérance aux stress. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de proline est susceptible d'augmenter la performance en réponse au stress hydrique.

Certains auteurs pensent que l'augmentation du taux de la proline est un symptôme de stress (Hanson et Hitz, 1982) qui résulte d'un déséquilibre dans les voies métaboliques. D'autres auteurs trouvent que cette accumulation est due à la capacité de la proline à jouer un rôle principal dans l'ajustement osmotique (Hare *et al.*, 1998), un rôle de protection des systèmes enzymatiques et membranaires (Albouchi *et al.*, 1997) et aussi un rôle de source d'énergie, de carbone et d'azote car sa synthèse est liée au métabolisme du sucre et à la respiration (Zhang *et al.*, 1982).

La proline a probablement de nombreuses fonctions dans la protection de la cellule contre les effets du stress osmotique, telles que la stabilisation des structures cellulaires, la

prévention des effets des ROS et elle pourrait même participer à la signalisation du stress (Nanjo *et al.*, 1999).

La proline est aussi le précurseur de la proline bétaine et l'hydroxyproline, excellents osmoprotecteurs découverts chez certaines plantes des familles Aizoacées, légumineuses, rutacées et plumbaginacées (Rathinasabapathi, 2002).

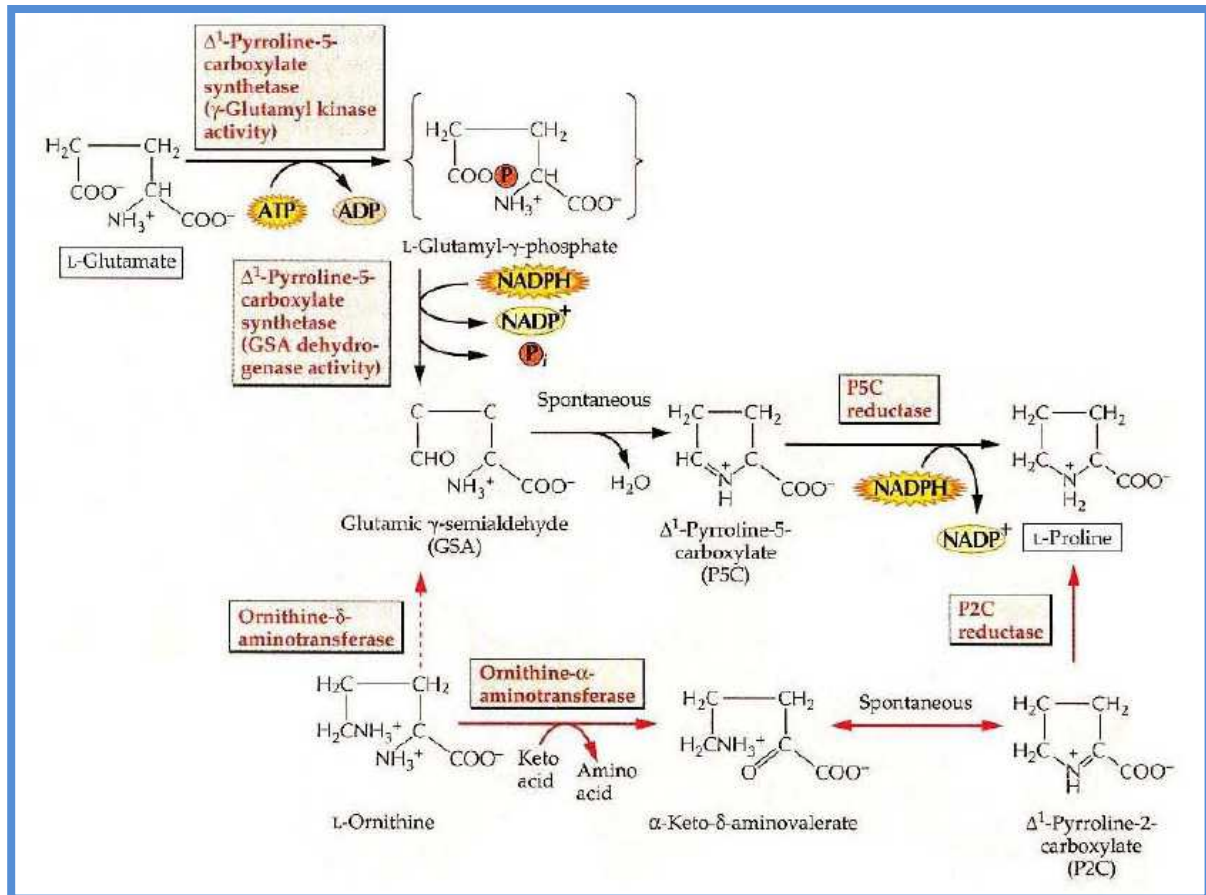


Figure 7 : Voie de biosynthèse de la proline chez les plantes. La voie dérivée du glutamate est bien établie (flèches noires). En rouge la voie de l'ornithine dont l'importance reste à déterminer. (Bray *et al.*, 2000)

II.2.6.2- Sucres et dérivés

Si les sucres sont les éléments carbonés primaires synthétisés et distribués dans toute la plante lors de la photosynthèse, ils ont également un rôle non énergétique d'osmorégulateurs et d'osmoprotectants. L'augmentation de la teneur en sucres ou dérivés, et leur rôle dans la réponse aux stress hydrique a été montrée depuis longtemps chez de nombreuses espèces (Gorham *et al.*, 1981). L'accumulation de saccharose pendant le stress hydrique est observée chez *C. plantagineum*: la déshydratation induit la conversion du 2-octulose, un sucre à huit-carbone, en saccharose (Bianchi *et al.*, 1991). Cette conversion est corrélée à l'augmentation de l'expression des gènes de la saccharose synthase (SS) et de la saccharose phosphate synthase (SPS) (Ingram *et al.*, 1997 ; Kleines *et al.*, 1999). Ces deux enzymes (SS et SPS) sont considérées comme principalement impliquées dans la régulation de la synthèse du

saccharose (Pelah *et al.*, 1997 ; Dejardin *et al.*, 1999). L'évidence d'un rôle de la SPS dans l'accumulation de saccharose pendant le déficit hydrique a été fournie par une stratégie antisens chez la pomme de terre: l'augmentation de saccharose induite par le stress hydrique a été complètement supprimée chez les plantes antisens et par conséquent, les capacités d'alimentation en eau et de croissance ont été largement diminuées (Geigenberger *et al.*, 1999). D'autres plantes soumises aux conditions de déshydratation sont caractérisées par l'accumulation d'hexoses (glucose, fructose...), associée à une augmentation de l'activité de l'invertase acide vacuolaire (enzyme clivant le saccharose en glucose et fructose) (Pelleschi *et al.*, 1999) dans les tissus où l'activité de la saccharose phosphate synthétase est faible (Vanden, Ende et Van Laere, 1995).

Les sucres solubles peuvent provenir également de l'hydrolyse de l'amidon en glucose ce qui explique la diminution de la quantité d'amidon foliaire durant la période de stress (Bensari., 1989).

Certains auteurs ont mis en évidence le rôle protecteur de ces sucres solubles sur les membranes, mitochondriales en particulier (Todd, 1972 ; Duffus et Ibinnie, 1990).

Des travaux sur le métabolisme du tréhalose, un disaccharide non réducteur composé de deux molécules de glucose reliées entre elles par une liaison α,α -1,1 particulièrement stable, ont révélé l'importance des effets régulateurs du tréhalose sur la croissance, le développement et les résistances aux stress (Penna, 2003). Le tréhalose et le tréhalose-6 phosphate seraient impliqués dans un grand nombre de régulations, en interaction avec les voies de signalisation des sucres solubles, toutefois, les mécanismes de ces interactions restent à déterminer.

II.2.7- Transduction du signal

Plusieurs familles de protéines (kinases et phosphatases) semblent être impliquées dans la transduction du signal et dans la réponse au stress. Leur rôle, s'il est difficilement contestable, n'est pour l'instant pas encore très bien caractérisé ; en effet, les substrats de ces enzymes sont le plus souvent inconnus.

II.2.7.1- Les kinases

Les cascades de MAPK forment des modules de signalisation souvent identifiés chez les eucaryotes. Elles fonctionnent par chaînes de trois, qui se phosphorylent l'une l'autre : une MAPKK kinase phosphoryle sur un résidu sérine ou thréonine une MAPK kinase qui phosphoryle une MAP kinase sur une thréonine et une tyrosine de sa boucle d'activation. Cela provoque généralement la translocation de la MAPK vers le noyau ou simplement son déplacement à un autre endroit du cytoplasme, où elle phosphorylera des protéines spécifiques. En amont de cette cascade, on trouve souvent d'autres kinases ou des protéines G (Bartels et Sunkar, 2005).

D'autres kinases que les MAPK ont un rôle à la fois dans la réponse à une déshydratation et à d'autres stress : ADR1 (activated disease resistance) présente des homologies avec une sérine/ thréonine kinase et est connue pour son rôle dans la réponse aux stress biotiques, mais elle est aussi impliquée dans la tolérance à la déshydratation en liaison avec ABI1 (Chini *et al.*, 2004) [ABI1 est une phosphatase qui semble être un régulateur négatif de la réponse à l'ABA dans les graines et chez les plantes au stade végétatif (Leung *et al.*, 1997)].

II.2.7.2- Les phosphatases

Il existe deux groupes importants de phosphatases : les phosphatases de phosphoprotéines ou PPases qui déphosphorylent des sérines et des thréonines et les phosphatases de phosphotyrosines ou PTPases.

D'après des résultats obtenus chez la levure, les PTPases se situent souvent en amont de cascades de MAPK, qui en retour induisent leur expression, formant ainsi une boucle de régulation négative (Bartels et Sunkar, 2005).

II.2.7.3- Les phospholipides

Les phospholipides contenus dans les membranes tel le phosphatidyl inositol (PI) sont une source de multiples molécules de signalisation. Dans les cellules de garde, l'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP3) qui dérive du PI par l'action d'une phospholipase C, le myo-inositol hexakisphosphate (InsP6) et l'acide phosphatidique sont des acteurs majeurs de la fermeture des stomates en réponse à l'ABA. L'InsP3 et l'acide phosphatidique, sont également impliqués dans la réponse à la déshydratation dans le reste de la plante.

II.2.7.4- Les ions Ca²⁺

Le calcium est un messager secondaire majeur de la signalisation du stress hydrique. Les CDPK sont des kinases dépendantes du Ca²⁺. Plusieurs d'entre elles sont induites par un stress osmotique (Bartels et Sunkar, 2005).

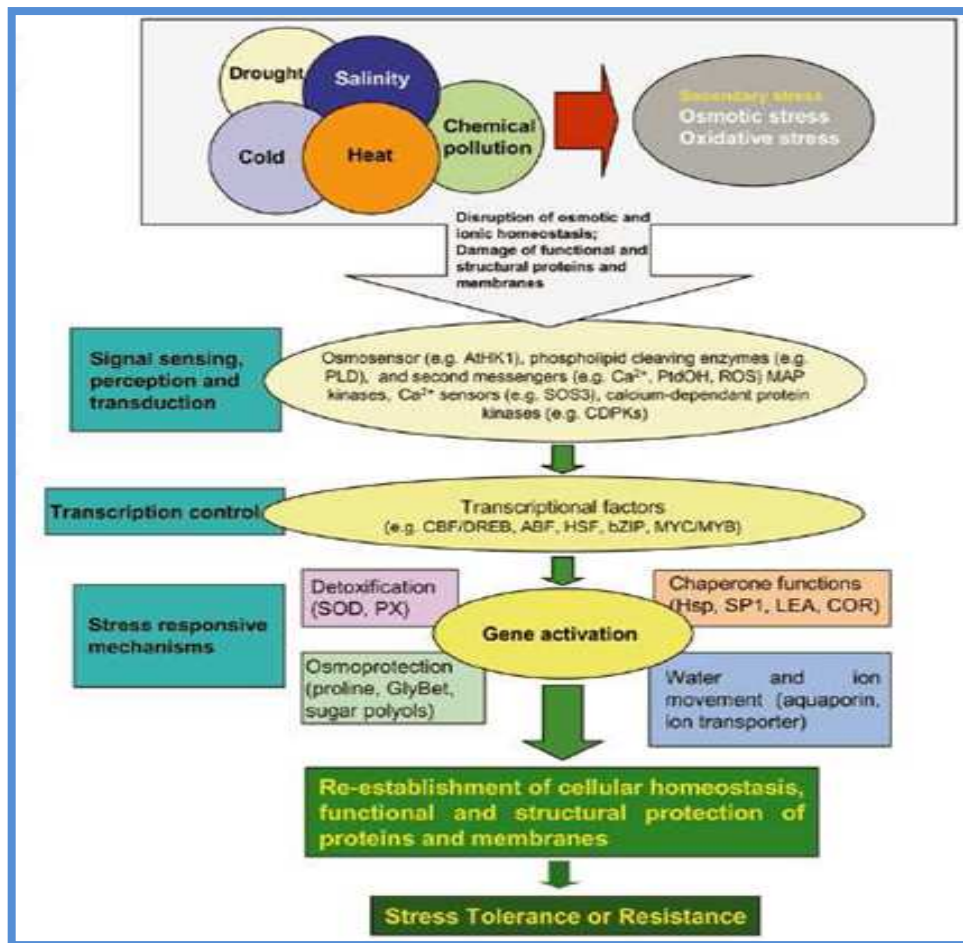


Figure 8 : Processus de la perception du signal à la mise en place des mécanismes de résistance et/ou tolérance par la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse de la plante à des stress abiotiques. Les gènes régulés peuvent intervenir dans la détoxification, l'osmoprotection, les fonctions chaperonnes et les flux d'eau et d'ions. (Wang *et al.*, 2003)

II.2.8- Les protéines des stress

Les stress abiotiques sont à l'origine de dysfonctionnements protéiques. La plante va activer de nombreux gènes permettant d'accumuler des protéines parmi lesquelles des HSP (Heat-shock protéins), des LEA (Late embryogenesis abundant proteins) et autres chaperonnes qui vont jouer un rôle de protection de la cellule. Elles vont stabiliser les protéines et les membranes et permettre de retrouver les conformations protéiques actives en condition de stress (Wang *et al.*, 2003).

II.2.8.1- Protéines heat-shock

Historiquement, l'observation du savant italien R. Ritossa sur l'expression des gènes de la *Drosophila melanogaster* après l'exposition à la chaleur fut le début de la découverte des protéines de choc thermique. Le résultat était une augmentation de la synthèse des protéines qui s'est produite aussi par l'utilisation d'autres facteurs de stress tels que l'azote, le 2,4-dinitrophénol et le salicylate (Ritossa, 1962). Ces protéines ont par la suite été identifiées et

nommées protéines de choc thermique « heat shock protein » (Hsps) (Tissieres *et al.*, 1974).

Étant donné qu'un déficit cellulaire en eau cause la dénaturation de certaines protéines, la présence de chaperonnes permettant de les structurer et de les assembler correctement, est essentielle à la mise en place de la tolérance au stress. Le rôle de certaines protéines heat-shock (Hsp) est de ce type. Il a en particulier été prouvé qu'elles étaient capables *in vitro* de contribuer à faire reprendre à des protéines dénaturées leur configuration native et d'empêcher leur agrégation sous l'effet de la chaleur (Lee *et al.*, 1995).

Les Hsp sont divisées en cinq familles en fonction de la taille des protéines produites : les Hsp70 (DnaK), les Hsp60, les Hsp90, les Hsp100 (Clp) et les sHsp (small Hsp) dont la taille varie (<40 kDa). Si elles ont été mises en évidence lors d'expositions à des températures élevées, on les trouve également surexprimées lors de l'exposition des plantes à la sécheresse, aux fortes teneurs en sel, à des agressions chimiques ou des stress oxydatifs.

Les Hsp60, Hsp70 et les Hsp90 vont interagir avec de nombreuses protéines co-chaperonnes qui vont réguler leur activité ou faciliter leur action de repliement protéique. Les HSPs vont également interagir entre elles pour former un véritable réseau de protéines chaperonnes et agir en synergie avec les autres mécanismes de réponse au stress (Wang *et al.*, 2004).

Les Hsp70 vont empêcher la formation d'agrégats protéiques et permettre aux protéines de se replier pour adopter une conformation active. Elles sont aussi impliquées dans les transports protéiques, la transduction du signal et l'activation de la transcription. Rhoads *et al.*, (2005) ont montré que la protéine Hsp70 cytosolique en se liant à des HSF (heat shock factor) exercerait un rétrocontrôle sur l'expression du gène Hsp70. Ce type de régulation concernerait aussi les sHsp.

En plus du rôle de contrôle du repliement, les Hsp90 (Miloni et Hatzopoulos 1997) se distinguent en intervenant dans les réseaux de transduction du signal, le contrôle du cycle cellulaire, la dégradation des protéines et la destination des protéines.

Les Hsp100/clp vont interagir avec les Hsp70 et les sHsp pour désagréger et déplier les complexes protéiques et permettre leur solubilisation puis leur repliement dans la conformation correcte.

Des Hsp100 cytosoliques sont nécessaires pour la tolérance à une hausse de température chez les plantes, mais elles ne sont pas nécessaires pour la germination et la croissance en absence de stress (Queitsch *et al.*, 2000; Hong et Vierling, 2001).

D'autres protéines Hsp100 ont des fonctions essentielles pour le développement des chloroplastes (Lee *et al.*, 2006). Il semble que cette classe des Hsp participe également à rétablir une situation normale à l'organisme après un stress (Gurley., 2000).

Les sHsp (small heat-shock protéine) ont en commun un domaine conservé de 90 acides aminés appelé Alpha-crystallin domain (ACD). C'est la famille la plus exprimée et répandue chez les plantes. Les sHsp ont une très grande affinité pour se lier aux protéines dans leur forme non native et vont empêcher leur agrégation. Elles interagissent alors avec les protéines chaperonnes ATP dépendantes (Hsp 70) pour replier les protéines sous leur forme native.

En général, les principales Hsp qui sont exprimées en grande quantité pendant le stress, ont des fonctions liées car elles atténuent les problèmes inadaptés des pliages et d'agrégation des protéines (Queitsch *et al.*, 2000).

Nakamoto et Vigh, (2007) suggèrent que les petites protéines de choc thermique peuvent jouer un rôle important dans le contrôle de la qualité des membranes ce qui contribue au maintien de l'intégrité membranaire en particulier en conditions de stress.

Feder et Hofmann (1999) après étude sur les aspects physiologiques, écologiques et évolutionnaires des Hsp concluent que :

- L'expression des Hsp pourrait se produire dans l'environnement naturel.
- Les gènes Hsp sont présents dans toutes les espèces mais que leur expression varie selon les conditions.
- L'expression des Hsp pourrait être corrélée avec la résistance aux stress.
- Le seuil d'expression des différents Hsp est corrélé avec l'intensité du stress.

II.2.8.2- Les protéines LEA

Ce sont les protéines majoritaires des embryons matures. Elles sont en général induites dans les parties végétatives par un stress osmotique, pendant lequel, comme dans l'embryon, leur accumulation en réponse à l'ABA est corrélée avec l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Bartels et Sunkar, 2005). Ce sont la plupart du temps des protéines petites et hydrophiles, résistantes à la chaleur. Chez plusieurs espèces, leur surexpression confère une meilleure résistance à la déshydratation ou au froid.

La classification des LEA a longtemps été discutée, mais récemment, elles ont été regroupées en 9 groupes sur la base de leurs similitudes de séquence. Le groupe le plus important est LEA-4, dont les protéines pourraient former des dimères capables de séquestrer des ions ; les déhydrines sont également bien représentées et sont supposées jouer un rôle dans la préservation des protéines et des structures membranaires ; le groupe LEA-5 pourrait intervenir dans la liaison ou le remplacement de l'eau (Hundertmark et Hinch, 2008; Bartels et Sunkar, 2005).

Toutes les LEA, exceptées celles du groupe 5, sont très hydrophiles et stables à haute température souvent même après ébullition. Les fonctions des LEA restent largement méconnues. Mais si l'on considère leur haute solubilité associée à de fortes concentrations et la présence de conformation en hélice α , il est peu probable que leur fonction soit enzymatique. Par contre leur thermo stabilité, leur structure, leur accumulation dans les graines et lors de stress hydriques suggèrent que les LEA jouent un rôle fondamental dans la tolérance à la dessiccation.

Des hypothèses ont été avancées sur leur rôle possible de soluté permettant de conserver une hydratation minimum des cellules et de protéger les structures cytoplasmiques. La fonction de protection des protéines par les LEA a été montrée chez le pois (Grelet *et al.* 2005).

Tous les types de LEA ne sont pas encore connus. Récemment, le gène CpEdi-9 codant pour une protéine hydrophile a été découvert chez *C. plantagineum*. La séquence ne donnait aucune homologie nucléotidique ou protéique avec des gènes connus mais la structure de la protéine et certains motifs ont permis de la rapprocher des Déhydrines ou des LEA du groupe 3.

II.2.8.3- Aquaporines

Les aquaporines sont des canaux spécifiques de passage de l'eau situés sur les membranes plasmiques ou vacuolaires. Elles facilitent l'équilibre osmotique en permettant un transport de l'eau additionnel à la diffusion à travers les membranes (Kjellbom *et al.*, 1999). Elles font partie de la famille des MIP (major intrinsic proteins) et sont divisées en deux groupes les TIP (tonoplast intrinsic proteins) dans la membrane vacuolaire et les PIP (plasma membrane intrinsic proteins). *Arabidopsis* compte dans son génome au moins 30 aquaporines, dont certaines, telles que RD28 (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992), sont induites par différents types de stress tandis que d'autres sont réprimées, une régulation qui permettrait de jouer sur les flux d'eau entre différents types de cellules afin d'optimiser son utilisation pendant le stress (Bartels et Sunkar, 2005; Alexandersson *et al.*, 2005). Ainsi, l'exposition des racines d'*Arabidopsis* à un stress salin, provoque des changements d'expression et de localisation cellulaire des aquaporines, PIP1, PIP2, TIP1 et TIP2 montrant l'importance des aquaporines dans le transport de l'eau au niveau des racines en cas de stress hydrique (Boursiac *et al.*, 2005).

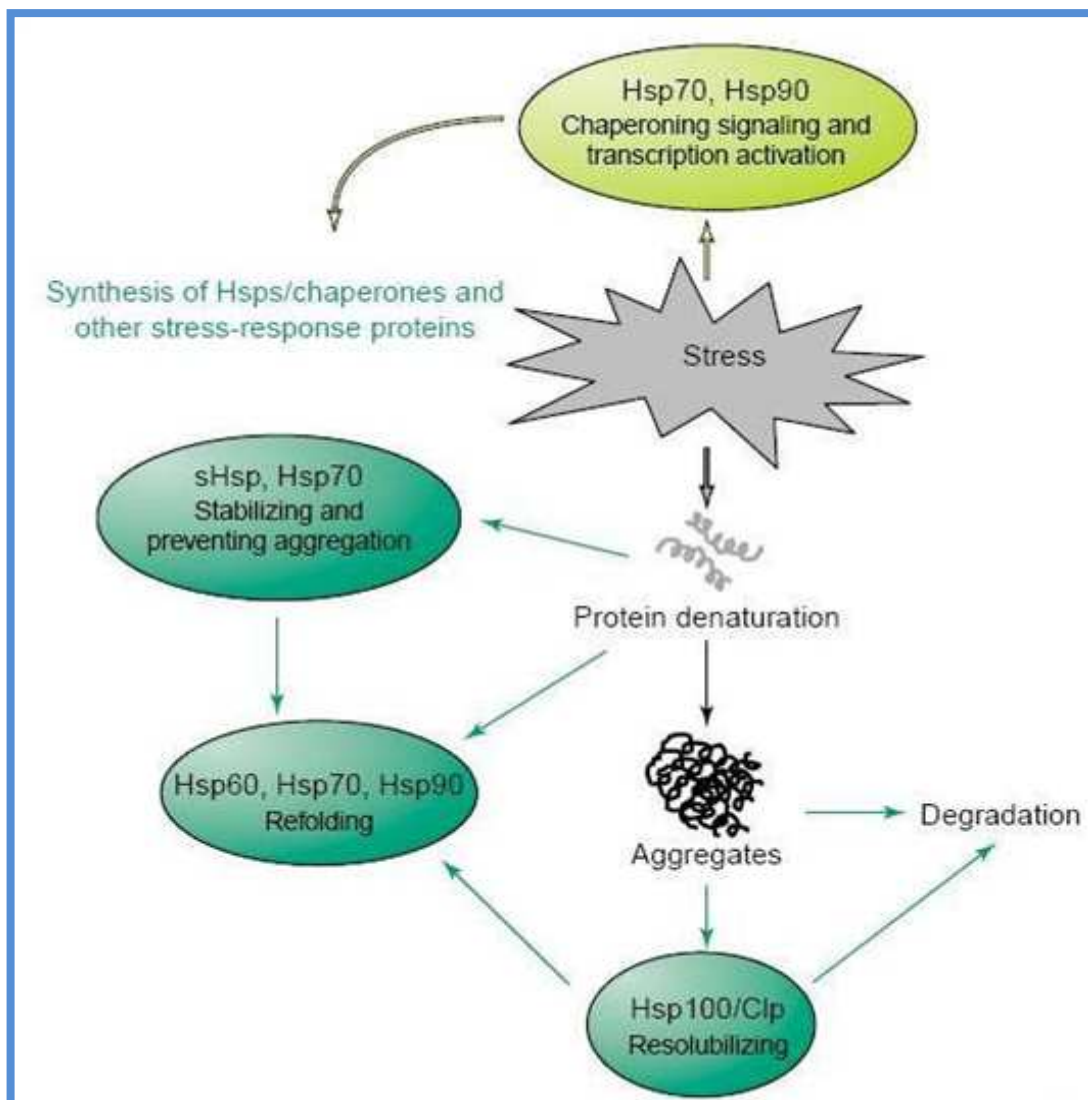


Figure 9 : Rôle des protéines HSP lors d'un stress (Wang *et al.*, 2003)

II.2.8.4- Les protéases

Une augmentation de la protéolyse lors d'un stress hydrique pourrait permettre d'éliminer les protéines endommagées par le déficit en eau et les ROS et/ou de remobiliser de l'azote (Bartels and Sunkar, 2005). Plusieurs protéases d'*Arabidopsis* sont induites par une déshydratation (Seki *et al.*, 2002 ; Koizumi *et al.*, 1993).

D'autres protéines telles que les peroxiredoxines qui permettent de détoxifier les peroxydes (eau oxygénée, hydroperoxydes...) en les réduisant en alcool., les thioredoxines dont la CDSP 32 (chloroplast drought induced stress protein) une protéine chloroplastique avec un module Trx actif en position C-terminale qui, comme son nom l'indique, est impliquée dans la réponse à différents stress oxydants et notamment à un stress hydrique sévère (Rey *et al.*, 1998 ; Broin *et al.*, 2000) ou les sulfoxides reductases, sont impliquées dans la détoxification des effets des ROS, elles sont également induites par une déshydratation, toutefois, leur rôle dans la tolérance à ce stress reste encore à étudier (Bartels et Sunkar, 2005).

Matériels
et
méthodes

III- Matériel et méthodes

III.1- Matériel végétal et application du stress hydrique

III.1- Systématique et botanique

III.1.1- Classification

Règne : *Plantae*

Embranchement : *spermatophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Rosidae*

Ordre : *fabales*

Famille : *fabaceae*

Tribu : *Lotae*

Genre : *Lens*

Genre espèce : *Lens culinaris* L



Figure 10: morphologie de la partie aérienne de *Lens culinaris* L

Notre étude a été réalisée sur deux variétés de la lentille *Lens culinaris* L (fig.10), la variété Balkan 755 Amir et la variété lentille de champagne.

Les graines des deux variétés présentent un aspect rond mais de couleur et de taille différente. Les graines de la variété Balkan 755 Amir sont aplaties, ont un diamètre d'environ 0,8 cm et sont d'une couleur verdâtre ; Les graines de la deuxième variété ont un diamètre d'environ 0,4 cm, sont arrondies et de couleur marron (fig. 11).

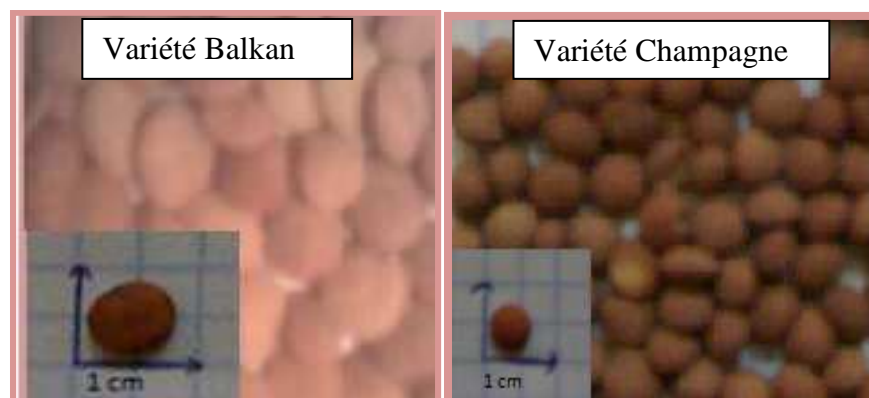


Figure 11 : Graines de lentille (variété Balkan et variété Champagne).

III.1.2- Mise en germination des graines

Les graines sont désinfectées avec de l'hydrochlorite de sodium à 12° pendant 5 min, puis rincées plusieurs fois à l'eau courante et enfin à l'eau distillée. Les graines sont mises à germer dans des boîtes de Petri tapissées d'une double couche de papier absorbant. Les boîtes sont arrosées avec de l'eau distillée

La germination se déroule dans une étuve à une température de 25° C.

III.1.3- Mise en culture

Après 3 jours de la mise en germination (après apparition de la radicule), les graines en germination sont mises dans des pots contenant 100 g de terreau à raison de 5 graines par pot. Les pots sont placés dans une chambre de culture avec des conditions de température et éclairement contrôlées (température 25° C, 16 h lumière et 8 h d'obscurité).

III.1.4- Application du stress

Après 15 jours de croissance, les plantules subissent un stress hydrique de 3, 6, 9, 12 et 15 jours par arrêt d'arrosage. Un lot de chaque variété a été arrosé régulièrement et a été considéré comme contrôle (témoin).

III.2 Méthodes

III.2.1- Détermination de la teneur relative en eau (TRE)

La mesure de la TRE est une ancienne méthode qui est très utilisée actuellement afin d'estimer le statut de l'eau de la plante et en particulier le déficit hydrique. Sa mesure nécessite peu de moyens dans l'ensemble. Pour déterminer la TRE, dans un premier temps, on pèse le poids de la matière végétale fraîche de fragments foliaires (PF). Ensuite, ces fragments sont mis à flotter dans l'eau (24h) puis pesés pour déterminer leur poids de turgescence (PT). Le poids de matière végétale sèche (PS) est obtenu après passage à l'étuve (48 h à 80° C). La TRE est calculée comme suit :

$$TRE (\%) = [(PF-PS)/(PT-PS)] \times 100$$

Les prélèvements sont effectués à la même heure et dans les mêmes conditions.

III.2.2- Mesure de la longueur des parties aériennes

Les longueurs des parties aériennes sont mesurées à l'aide d'une règle graduée. Les mesures des parties aériennes s'effectuent du collet jusqu'au bourgeon terminal. Pour chaque traitement une moyenne de cinq (5) individus est établie. Les résultats sont exprimés en cm.

III.2.3- Estimation de la fuite relative des électrolytes

La fuite des électrolytes des cellules vers le milieu extérieur a été mesurée suivant le protocole décrit par Dionisio-Sese et Tobita (1998).

Dans un premier temps, 20 fragments foliaires de 0,5 cm de longueur sont mis à flotter dans 30 ml d'eau distillée. La conductivité (E) correspondante est mesurée après 60 minutes. Les fragments sont ensuite mis à bouillir pendant 1 heure, après refroidissement, la lecture de la conductivité correspondante à (ET) est également effectuée. L'intégrité membranaire est déterminée par le rapport entre la conductivité des fragments foliaires mis dans l'eau non bouillie (E) et celle des fragments mis à bouillir (ET) selon l'équation suivante :

$$\text{Fuite relative d'ions (\%)} = (E/ET)*100$$

III.2.4- Etude biochimique

III.2.4.1- Détermination de la teneur en pigments foliaires

10 mg de matière végétale fraîche (MVF) sont broyés à sec puis dans 2 ml d'acétone à 80 %. Le broyat est centrifugé à 3000 tr.mn⁻¹ pendant 3 minutes. Le surnageant qui contient les pigments est récupéré.

Les densités optiques (DO) sont lues aux longueurs d'onde suivantes après l'étalonnage du spectrophotomètre grâce à un blanc préparé à partir de l'acétone à 80% .

$$\lambda_a=647nm \text{ et } \lambda_b=663 \text{ pour la chlorophylle a et b}$$

$$\lambda_c= 470 \text{ nm pour les caroténoïdes}$$

La teneur en chlorophylles et en caroténoïdes est déterminée selon les équations de Lichtenthaler (1987) :

$$\text{chl a} = 12,25.(DO\lambda_b)-2,79.(DO\lambda_a)$$

$$\text{chl b} = 21,5.(DO\lambda_a)-5,1.(DO\lambda_b)$$

$$\text{chl a} + \text{chl b} = 7,15.(DO\lambda_b) + 18,71.(DO\lambda_a)$$

$$\text{caroténoïdes} = [1000.(DO\lambda_c) - 1,82.(Chl a) - 85,02.(Chl b)]/198$$

Les teneurs en pigments foliaires sont exprimées en µg⁻¹.g de MVS (matière végétale sèche).

III.2.4.2- Extraction et dosage des protéines totales

Principe

Le dosage des protéines est fait selon la technique de Bradford (1976). Cette méthode consiste à utiliser le bleu de Coomassie G 250, qui forme un complexe d'une coloration bleue avec les protéines, la coloration est proportionnelle à la concentration de protéines présentes et elle se développe rapidement. L'absorption maximum du complexe protéines-bleu de Coomassie se situe à 595 nm.

Extraction des protéines

L'extraction des protéines totales a été réalisée par broyage au froid de 100 mg de matière végétale fraîche avec 1 ml du tampon Tris-HCl 0.1 M (pH 8.1), contenant du β mercaptoéthanol (réduit les ponts disulfures) à 0.05 % et du saccharose à 10 %. Les broyats ainsi obtenus ont été centrifugés à 15 000 g à 4° C pendant 10 min.

Les surnageants ont été récupérés puis conservés à 4° C jusqu'à leur utilisation pour les activités enzymatiques et la séparation des protéines par électrophorèse.

Dosage des protéines solubles totales

Les protéines solubles sont dosées selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant le réactif de Bradford (bleu de Coomassie + éthanol + acide phosphorique). A 50 μ l d'extrait de protéines sont ajoutés 3 ml de réactif de Biorad, l'ensemble est homogénéisé et laissé incuber, à l'obscurité, pour quelques minutes.

La lecture des densités optiques est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm.

La teneur en protéines (mg.g^{-1} MVS) est déterminée par référence à une gamme étalon préparée à partir d'une solution de BSA (Bovin Serum Albumin) à 1 mg.ml^{-1} (fig. 12).

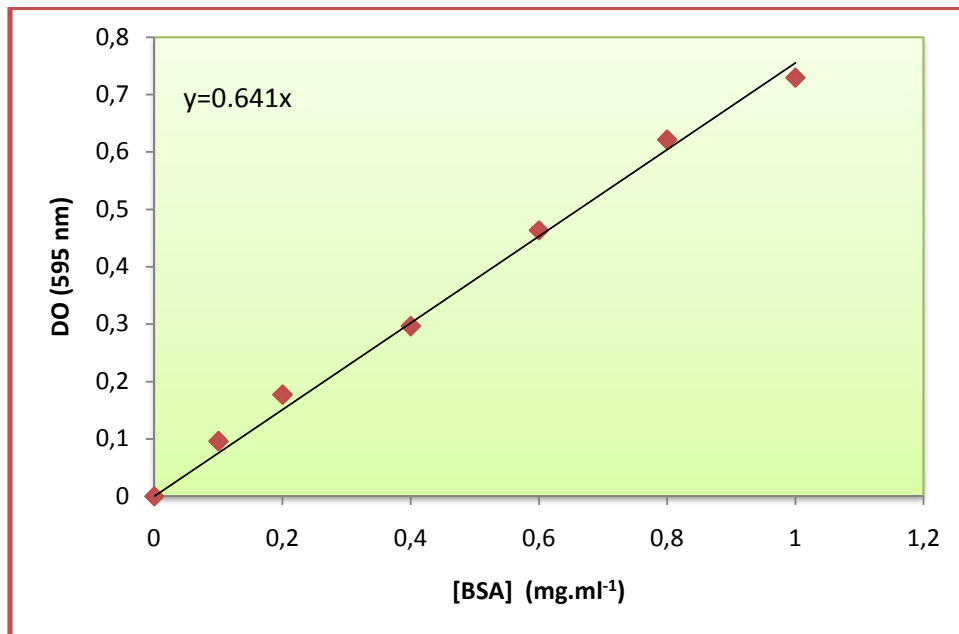


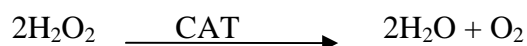
Figure 12 : Courbe étalon des protéines (BSA).

III.2.4.3- Mesure des activités enzymatiques

a- Activité catalase totale (CAT)

Principe

Le principe de mesure de l'activité catalase repose sur les propriétés de cette famille d'enzymes à dégrader les molécules de H_2O_2 .



Dosage

Cette activité est mesurée sur des protéines totales extraites comme décrit dans la partie III.2.4.2 (Dosage des protéines solubles totales).

L'activité catalase est déterminée en suivant la disparition de l' H_2O_2 ($\epsilon=36\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) à 240 nm suivant la méthode décrite par Dorey et al (1998). Le mélange réactionnel (1 ml) est constitué de 50 mM d'un tampon phosphate pH 7.5. Le zéro est réalisé à 240 nm contre une cuve en quartz contenant le tampon et 30 μg de protéines. Sont ensuite ajoutés 10 mM d' H_2O_2 . L'ajout de H_2O_2 initie la réaction. Le déclin de l'absorbance est suivi pendant 30 s. L'activité est exprimée en nmoles de H_2O_2 dégradées par minute et par mg de protéines totales. La conversion de la vitesse initiale en activité spécifique de la catalase est exprimée par la formule suivante :

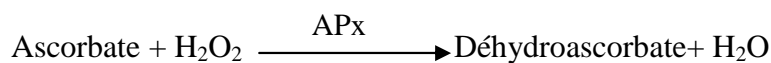
$$\text{Activité (nmole H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ prot}) = \Delta\text{DO. Min}^{-1} \times 1000/(36 \times \text{mg protéines}).$$

b- Activité soluble ascorbate peroxydase(APx)

Dans le cas de la mesure de l'activité soluble APx, les protéines ont été extraites comme décrit dans la partie III.2.4.2 (Dosage des protéines solubles totales).

Principe

L'activité ascorbate peroxydase est déterminée en suivant l'oxydation de l'ascorbate ($\epsilon=2,88 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) en monodeshydroascorbate à 290 nm.



Dosage

La méthode utilisée est celle décrite par Nakano et Asada (1980). Le milieu réactionnel (1ml) est constitué de 50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,5 et 0,1 mM Na_4EDTA . Le zéro est réalisé à 290 nm contre une cuve en quartz contenant le même volume de tampon et d'échantillon sont ensuite ajoutés successivement 0,5 mM d'ascorbate et 0,1 mM de H_2O_2 qui initie la réaction. La variation de l'absorbance (déclin de la DO) est mesurée pendant 30 s à 25°C. L'activité est exprimée en nmoles d'ascorbate oxydées par mg de protéines totales. La conversion de la vitesse initiale (changement de l'absorbance à 290nm) en activité spécifique de l'APX est exprimée comme suit :

$$\text{Activité (nmole d'ascorbate oxydé.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ prot}) = \Delta\text{DO. min}^{-1} \times 1000/(2.88 \times \text{mg protéines}).$$

III.2.4.4- Séparation des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide monodimensionnel, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La séparation des protéines est faite en fonction de leur poids moléculaire dans un gel de polyacrylamide à 12 % selon la technique de Laemmli (1970). Les protéines (20 μg de protéines par puits) sont additionnées de 25 % de tampon de charge dénaturant puis sont dénaturées 10 min à 90 °c, avant d'être déposées sur gel. Les protéines sont soumises à une électrophorèse d'environ 3 h à 150 V dans un tampon de migration Tris-glycine-SDS pH 8,5. Les protéines migrent successivement dans un gel de

concentration à 3 % de polyacrylamide puis dans un gel de séparation à 12 %. Dans le champ électrique, les protéines sont donc séparées en fonction de leur masse moléculaire et non de leur charge électrique. Un marqueur de taille Molecular Weight Marker est utilisé. Après la migration, les gels sont colorés pendant 12 h dans une solution de bleu de Coomassie, puis décolorés dans un mélange acide acétique-méthanol-eau.

III.2.4.5- Extraction et dosage de la proline

Principe

La technique utilisée est celle de Troll et Lindsley (1955) modifiée par Magné et Larher (1992). Cette technique est basée sur la capacité de la proline de réagir en milieu acide et à chaud avec la ninhydrine pour donner un composé de couleur rose, soluble dans les solvants organiques tel que le toluène.

Extraction

L'extraction de la proline a été effectuée par chauffage, au bain marie à 85° C, de 50 mg de substance végétale sèche avec 1 ml d'eau distillée pendant 30 min. Ensuite, une centrifugation de 10 minutes à 13000 tr/min est réalisée et le surnageant est récupéré. L'extraction est réalisée une deuxième fois avec un volume de 500 µl d'eau et le surnageant est ajouté au précédent.

Dosage

A 500 µl d'extrait de proline sont ajoutés 1 ml du réactif à la ninhydrine. Les tubes sont homogénéisés et placés dans un bain-marie à 95° C pendant 30 min. Ensuite, 3 ml de toluène sont ajoutés, après agitation au vortex, deux phases se développent :

- La phase supérieure organique contenant la proline est prélevée.
- La phase inférieure aqueuse est éliminée.

La densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 520 nm au spectrophotomètre.

La courbe étalon de la proline

Pour connaître la correspondance entre les densités optiques et les concentrations en proline, une courbe étalon est réalisée à partir de concentrations croissantes en proline, préparées à partir d'une solution mère de 1 mg/ml (fig. 13).

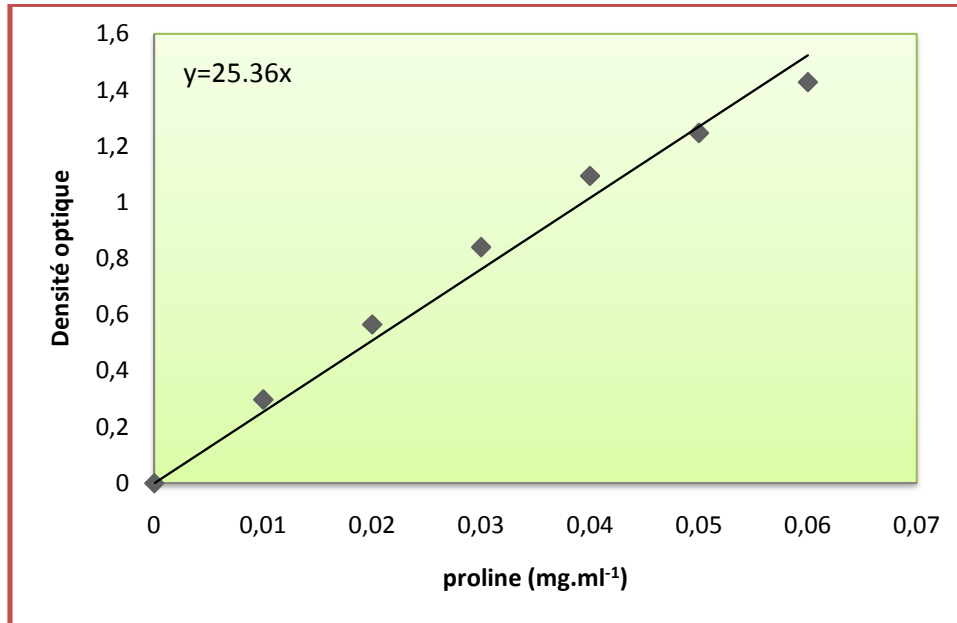


Figure 13 : Courbe étalon de la proline.

III.2.4.6- Extraction et dosage des sucres ethanolosolubles

Principe

Les sucres sont dosés selon la méthode de Mc Ready *et al* (1950). C'est une méthode colorimétrique basée sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide (H_2SO_4 concentré) à chaud. Les dérivés furfuraliques obtenus (5-hydroxyméthyl-furfural pour les hexoses) se condensent avec l'anthrone pour donner des produits colorés. Les différences de couleur obtenues (bleu-vert avec les hexoses, rouge avec les pentoses) donnent une certaine spécificité à la technique.

Extraction

L'extraction des sucres totaux et réducteurs a été effectuée par broyage de 100 mg de matière végétale fraîche dans 4 ml d'éthanol bouillant à 80 %. Les broyats ainsi obtenus ont été centrifugés à 5 000 g pendant 20 min. Les surnageants contenant les sucres ont été récupérés. L'extraction est réalisée deux fois. À chaque extraction le surnageant est prélevé et rajouté au précédent dans un tube et le tout est ajusté à 10 ml par de l'eau distillée.

Dosage

Le dosage des sucres est réalisé sur 0.5 ml de l'extrait glucidique auquel sont ajoutés 0.5 ml d'eau distillée et 2 ml de réactif à l'anthrone. Après agitation au vortex et passage au bain-marie à 100° C pendant 7 min, une coloration vert-bleue est observée.

Les mesures des densités optiques sont réalisées, après refroidissement des tubes, à une longueur d'onde de 630 nm.

La courbe étalon pour les sucres

La courbe étalon nous permet de tirer la correspondance entre les densités optiques et les concentrations en sucres. Elle est réalisée à l'aide de concentrations croissantes en glucose obtenues a partir d'une solution mère de 100 µg/ml (fig.14).

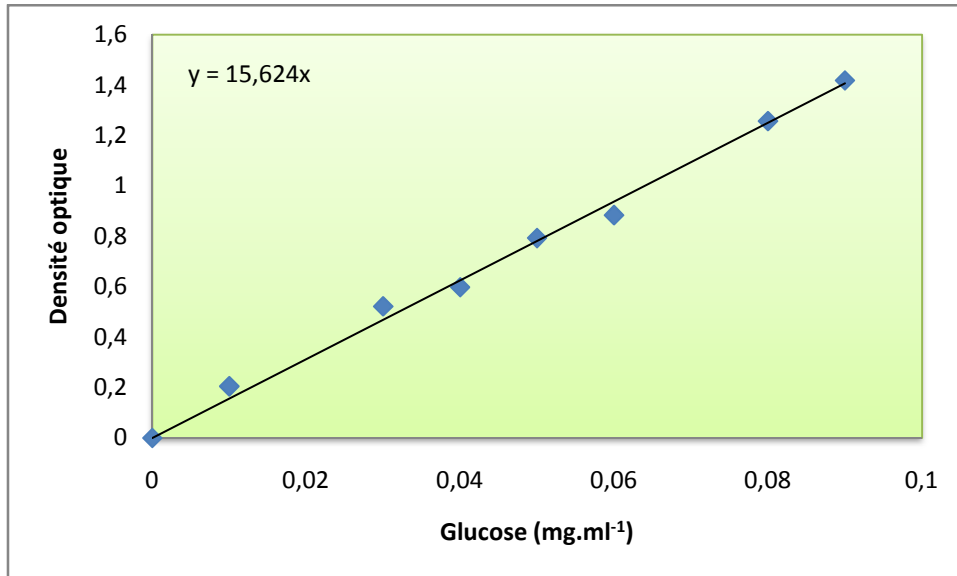


Figure 14 : Courbe étalon des sucres solubles (glucose).

III.2.4.7- Dosage des dérivés TBARS (Thiobarbiturie Acid Reactive Substances)

Principe

Le dosage des TBARS est considéré comme permettant de mesurer la peroxydation des lipides.

Lors d'un stress oxydatif, les acides gras polyinsaturés des membranes sont facilement peroxydés par les radicaux libres. Le malonyldialdehyde (MDA) est l'un des produits terminaux de cette peroxydation. Son dosage (Popham et Novacky, 1991) est réalisé par condensation en milieu acide et à chaud (95° C) avec l'acide thiobarbiturique (TBA). La réaction de l'acide thiobarbiturique avec le MDA permet la formation d'un complexe de couleur rose mesurable à 532 nm (fig. 15).

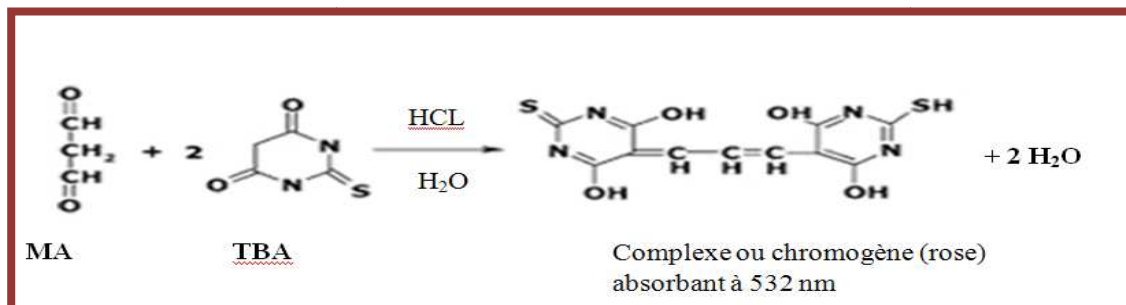


Figure 15 : la réaction de l'acide thiobarbiturique avec le MDA.

Extraction

Environ 100 mg de MVF sont broyés au froid puis homogénéisés dans 300 μl de tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,2 M pH 6,5 contenant 1% de Triton X-100 et 0,01% de butylhydroxytoluène. Une centrifugation de 20 min à 10 000 g à 4° C est réalisée en premier temps.

Dosage

120 μl de surnageant sont prélevés et sont ajoutés 300 μl de TCA 10 % (Acide trichloroacétique) et 1 % d'acide 2-thiobarbiturique 0,67% (préparé dans le TCA à 10%). Les échantillons sont bouillis à 95° C pendant 15 min puis refroidis 5 min dans la glace. Après une centrifugation de 10 000 g pendant 10 min à 4° C, le surnageant est dosé par spectrophotométrie à 532 nm.

Gamme étalon

Une gamme à des concentrations croissantes est utilisée à partir d'une solution mère à 1 μM d'un précurseur du MDA, 1, 1, 3, 3, tétraméthoxypropane (TMP) (fig. 16) Les teneurs en MDA sont exprimées en nmole.g^{-1} de MVF.

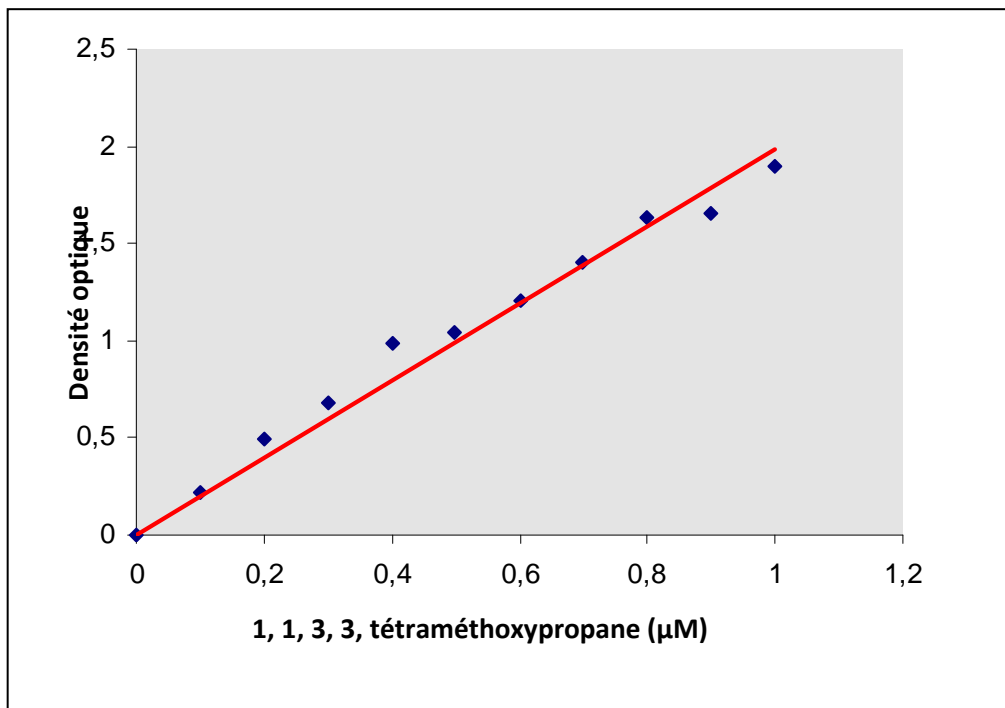


Figure 16 : Courbe étalon du 1, 1, 3, 3, tétraméthoxypropane (Précurseur du malonyldialdéhyde).

III.3- analyse statistique

Les résultats obtenus sont soumis à une analyse statistique par le test de Student. Le test de Student permet de comparer les moyennes de deux échantillons statistiques (on parle de test de conformité). Il tire son nom de la loi où on lit l'écart critique. Les tests de Student sont utilisés dans le cadre des tests relatifs à la moyenne des échantillons de petite taille.

Dans notre cas, le test de Student nous permet d'évaluer le comportement de chaque variété vis-à-vis la contrainte hydrique.

Les degrés de signification sont étudiés aux seuils :

- ✓ $P=0.05$ pour différence significative
- ✓ $P=0.01$ pour différence très significative
- ✓ $P=0.001$ pour différence hautement significative.

Résultats
et
discussions

IV- Résultats, interprétations et discussions

Le travail réalisé a porté sur les plantules des deux variétés de lentille, Balkan 755 Amir et champagne. Les mesures des différents paramètres morphophysologiques ont été effectuées au cours du stress (3, 6, 9, 12 et 15 jours d'arrêt d'arrosage).

Certains paramètres sont associés au mécanisme de la photosynthèse tels que les chlorophylles totales, les caroténoïdes et les glucides, d'autres sont liés aux dommages causés par le stress hydrique au niveau de la cellule (peroxydation des lipides) ou bien aux mécanismes de protection des plantules (activité catalase).

D'autres paramètres ont été également mesurés à savoir la teneur en protéines, la teneur en proline et la teneur relative en eau.

Les différents paramètres morpho-physiologiques et biochimiques des plantules témoins des deux variétés sont étudiés (après 12 jours d'arrêt d'arrosage) (Tableau I).

Tableau I : Mesures des paramètres morphologiques et biochimiques des plantules témoins des deux variétés de lentille.

Paramètres	Plantules témoins	
	Balkan 755 Amir	Champagne
Teneur relative en eau (%)	84,41 ± 2,55	81,67 ± 1,09
la croissance linéaire de la partie aérienne (cm)	32,80±3,26	36,33±3,26
Chlorophylles totales ($\mu\text{g}^{-1}\text{g}$ de MVS)	1266,7 ± 15,7	1073,9 ± 72,0
Caroténoïdes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS)	189,6 ± 2,1	204,8 ± 3,5
Proline ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS)	0,0078± 0,0013	0,0200± 0,0017
Sucres totaux ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS)	4,17 ± 0,20	3,79 ± 0,39
Protéines totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS)	50,21± 9,06	49,32 ± 4,48
Fuite relative d'électrolytes (%)	25,93 ± 3,36	36,20 ± 2,32
Malonyldialdehyde ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS)	9,93 ± 4,06	8,00 ± 1,37
Activité catalase (nmole de H_2O_2 réduit. $\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de protéines)	31,67 ± 10,18	73,29 ± 15,63
Activité ascorbate peroxydase (nmole. $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines)	432,28 ±111.05	605,021± 38.95

La comparaison des différents paramètres étudiés montre que les teneurs en protéines totales, sucres réducteurs ainsi que la teneur en substances réactives à l'acide thiobarbiturique chez les plantules témoins des deux variétés ne présentent pas de différence. Par contre, les teneurs en proline, en caroténoïdes, en protéines, les activités enzymatiques antioxydantes catalase et ascorbate peroxydase ainsi que la fuite relative des électrolytes chez les plantules témoins de la variété champagne s'avèrent plus élevées que celles des plantules témoins de la variété Balkan 755 Amir. Concernant la teneur relative en eau et la teneur en chlorophylles totales, elles sont plus importantes chez les plantules témoins de variété Balkan 755 Amir que chez la variété champagne.

IV.1- Effet du déficit hydrique sur la teneur relative en eau

IV.1.1- Résultats et interprétations

Les résultats obtenus permettent de conclure que la teneur relative en eau, chez les deux variétés, diminue au cours du stress. Cette diminution est plus importante et plus rapide chez la variété lentille Balkan 755 Amir que chez la variété lentille de champagne (fig.17).

Chez la variété Balkan 755 Amir, la teneur relative en eau chez le témoin est de $88,15 \pm 1,42$ %. Elle s'abaisse de 10,78 % dès 6 jours après arrêt d'arrosage puis atteint $33,38 \pm 4,62$ % après 12 jours d'arrêt d'arrosage soit une réduction de 60,44%. Après 12 jours d'arrêt d'arrosage, les plantules sont totalement déshydratées.

Chez la variété champagne, la TRE diminue plus lentement ; après 6 jours d'arrêt d'arrosage, la TRE passe de $82,90 \pm 1,99$ % à $80,41 \pm 0,15$ % soit une diminution de 5,65 %. Au bout de 15 jours d'arrêt d'arrosage, la TRE s'abaisse à $38,66 \pm 6,34$ % avec un pourcentage de variation de 54,85 %.

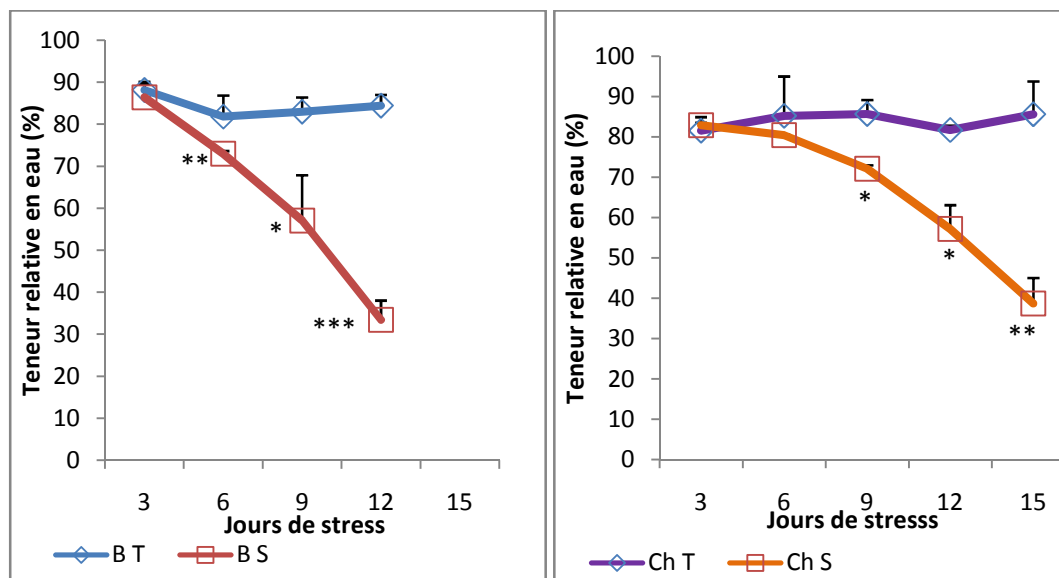


Figure 17 : effets du stress hydrique sur la teneur relative en eau des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

* différence significative par rapport au témoin ($P=0.005$)

** différence très significative par rapport au témoin ($P= 0.01$)

*** différence hautement significative par rapport au témoin ($P=0.001$)

IV.1.2- Discussion

La comparaison de l'évolution de la teneur en eau des deux variétés de lentille a montré que le stress hydrique entraîne une chute du pourcentage d'eau au niveau des feuilles. Cette chute devient de plus en plus nette au fur et à mesure que le niveau de stress s'accroît. Ces résultats sont conformes avec les résultats obtenus par Zerrad *et al.* (2008), Huseynova *et al.* (2010), qui ont également signalé que l'effet dépressif de la carence en eau sur l'état hydrique de la plante peut être irréversible si la période de

stress est prolongée. On note que cette diminution reste beaucoup plus accentuée pour la variété Balkan que pour la variété Champagne. Chez la variété Balkan, la diminution de la TRE est de 60,44 % par rapport à celle observée chez les plantules témoins. Par contre chez la variété Champagne, elle est de 54,85 % et elle atteint le niveau de $38,66 \pm 6,34$ % chez la variété Champagne (après 15 jours d'arrêt d'arrosage).

Matin *et al.* (1989) suggèrent que les génotypes qui arrivent à maintenir une TRE élevée sous stress hydrique sont des génotypes tolérant à la sécheresse. Ainsi Levitt, (1980) constate que la capacité de maintenir un potentiel hydrique élevé a été considérée comme un mécanisme qui permet à la plante d'esquiver la déshydratation.

IV. 2- Effet du stress sur la croissance linéaire de la partie aérienne

IV.2.1- Résultats et interprétations

Les résultats montrent que le stress hydrique a un effet négatif sur la croissance linéaire de la partie aérienne des deux variétés (fig.18).

Chez la variété Balkan 775 Amir, la longueur de la tige chez les plantules témoins varie de $22,82 \pm 4,62$ cm au 3^{ème} jour d'expérimentation à $32,80 \pm 3,26$ cm après 12 jours d'expérimentation. Chez les plantules stressées, la longueur de la partie aérienne évolue parallèlement à celle des plantules témoins avec cependant une réduction de 14,63 % par rapport aux plantules témoins après 12 jours d'arrêt d'arrosage.

Chez les plantules stressées de la variété Champagne, le stress hydrique ralentit la croissance linéaire de la partie aérienne entre 3 et 12 jours d'arrêt d'arrosage. Cette réduction est de 7,56 % après 3 jours d'arrêt d'arrosage. Après 9 jours d'arrêt d'arrosage, le pourcentage de la réduction de croissance est de -22,12 %. A partir de 12 jours d'arrêt d'arrosage, l'effet négatif du stress sur la croissance linéaire de la tige diminue (10,44 % seulement de réduction). A la fin de l'expérimentation, la longueur de la partie aérienne des plantules stressées ($40,33 \pm 1,69$ cm) est plus importante que celle des plantules témoins.

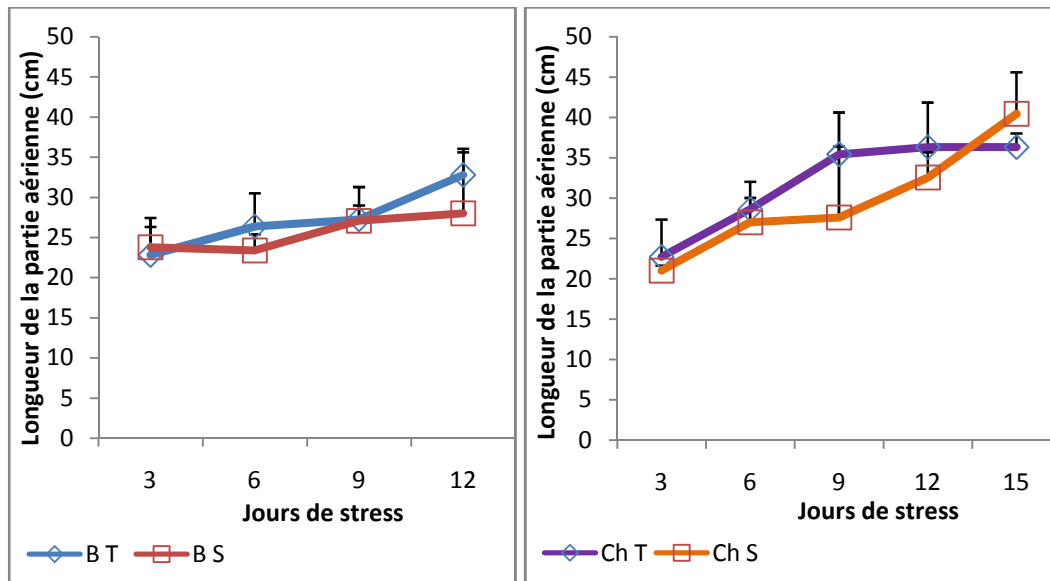


Figure 18 : Effet du stress sur la croissance linéaire de la partie aérienne des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d’arrosage progressif de 3 à 15 jours.

IV.2.2- Discussion

De nombreuses études ont montré que l’une des premières manifestations d’une diminution de la turgescence cellulaire est la réduction de la croissance (Kramer et Boyer, 1995 ; Saab et Sharp, 2004). Nos résultats montrent que la croissance linéaire de la partie aérienne des plantules des deux variétés de lentille, est réduite sous les conditions d’un déficit hydrique. Après 12 jours d’arrêt d’arrosage, cette réduction est de 14,63 % chez la variété Balkan 775 Amir et de 10,44 % chez la variété champagne.

Une diminution importante de la taille et de la longueur des entre nœuds des plants sous stress hydrique a déjà été rapportée (Attia, 2007 ; Brown et Taner 1983 ; Vidal *et al.*, 1981) Selon Brown et Taner (1983), le déficit hydrique réduit l’expansion foliaire et l’élargissement de tous les entre nœuds chez *Medicago sativa*. Gosse *et al.* (1982) et Hall (1993) rapportent que chez cette même espèce les plantes stressées sont plus petites que les plantes non stressées.

Le déficit hydrique induit aussi un déficit de la nutrition minérale (azotée et phosphatée) qui est dû principalement à des réductions de flux d’éléments vers les racines ce qui a pour conséquence une réduction de la croissance des plants (Gahoonia *et al.*, 1994 ; Dugo, 2002).

IV. 3- Effet du stress hydrique sur les teneurs en pigments photosynthétiques

IV.3.1- Résultats et interprétations

IV.3.1.1- Teneur en chlorophylles totales

La teneur en chlorophylles totales chez les plantules témoins de la variété Balkan 755 Amir est de $1230 \pm 127,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS. Au début du stress, cette valeur augmente chez les plantules stressées atteignant $1857,1 \pm 96 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS. Par contre, lorsque le stress s'intensifie (après 6 jours d'arrêt d'arrosage) la teneur en chlorophylles totales diminue progressivement, elle est de $922,8 \pm 86,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS après 12 jours d'arrêt d'arrosage (fig.19).

Chez la variété champagne, les mêmes observations sont faites. La teneur en chlorophylles totales chez les plantules témoins est de $1243,7 \pm 51,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS. Chez les plantules stressées, une augmentation de la teneur en chlorophylles totales est observée ; après 3 jours d'arrêt d'arrosage, elle est de $1909,1 \pm 145,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS. Lorsque le stress s'intensifie, la teneur en chlorophylles totales diminue fortement, atteignant après 15 jours d'arrêt d'arrosage la valeur de $281,1 \pm 38,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVS soit 7 fois moins la valeur maximale observée après 3 jours d'arrêt d'arrosage.

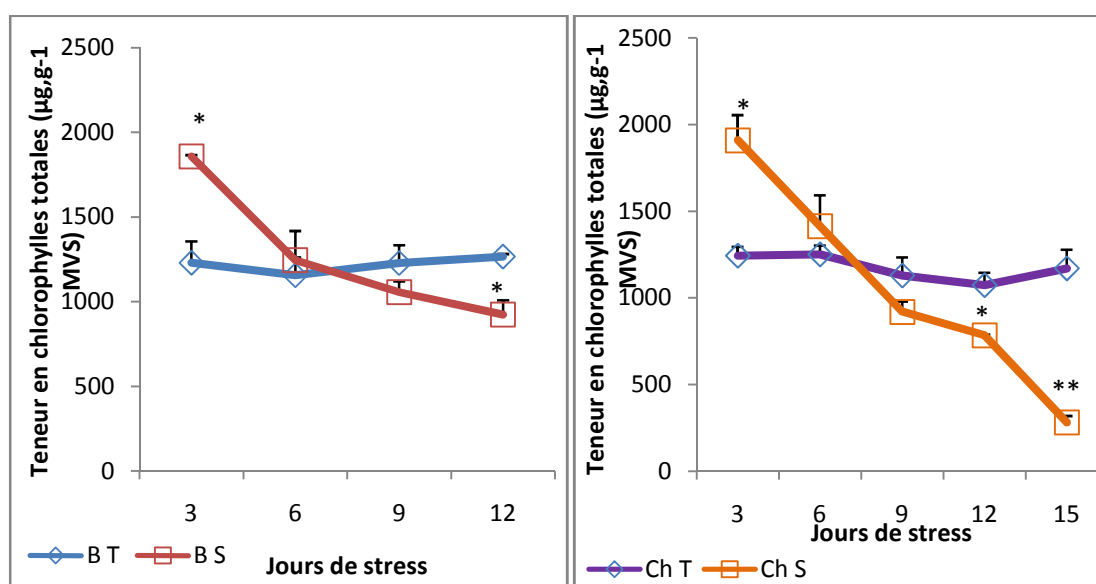


Figure 19 : Effets du stress hydrique sur la teneur en chlorophylles totales des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

* différence significative par rapport au témoin ($P=0.005$)

** différence très significative par rapport au témoin ($P= 0.01$)

IV.3.1.2- La teneur en caroténoïdes

Les caroténoïdes jouent un rôle dans la collecte de l'énergie lumineuse mais aussi dans la protection du système photosynthétique contre la photooxydation. Une diminution de la teneur en caroténoïdes peut entraîner la dégradation des chlorophylles.

Les résultats exprimés dans la figure 20, montrent qu'au début du stress, la teneur des caroténoïdes chez les plantules de la variété Balkan 755 Amir stressées, augmente par rapport à celle obtenue chez les plantules témoins : elle passe de $176 \pm 17,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ de MVS chez les témoins à $285,1 \pm 25,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ de MVS soit un pourcentage d'augmentation de 62,03 %. Lorsque le stress s'intensifie, la teneur en caroténoïdes chez les plantules stressées diminue progressivement. Chez les plantules sévèrement stressées (après 12 jours d'arrêt d'arrosage), la teneur en caroténoïdes est de $119,4 \pm 7,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ de MVS.

Chez la variété champagne, la teneur en caroténoïdes chez les plantules témoins est de $215,1 \pm 15,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ de MVS. Cette teneur subit une augmentation au début du stress (3 jours d'arrêt d'arrosage) pour atteindre une valeur de $283,7 \pm 47,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ de MVS. Dès 6 jours d'arrêt d'arrosage, la teneur des caroténoïdes diminue par rapport à la valeur maximale observée. Cette teneur n'est plus que de $55,7 \pm 7,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ de MVS soit une diminution de 72,73 %.

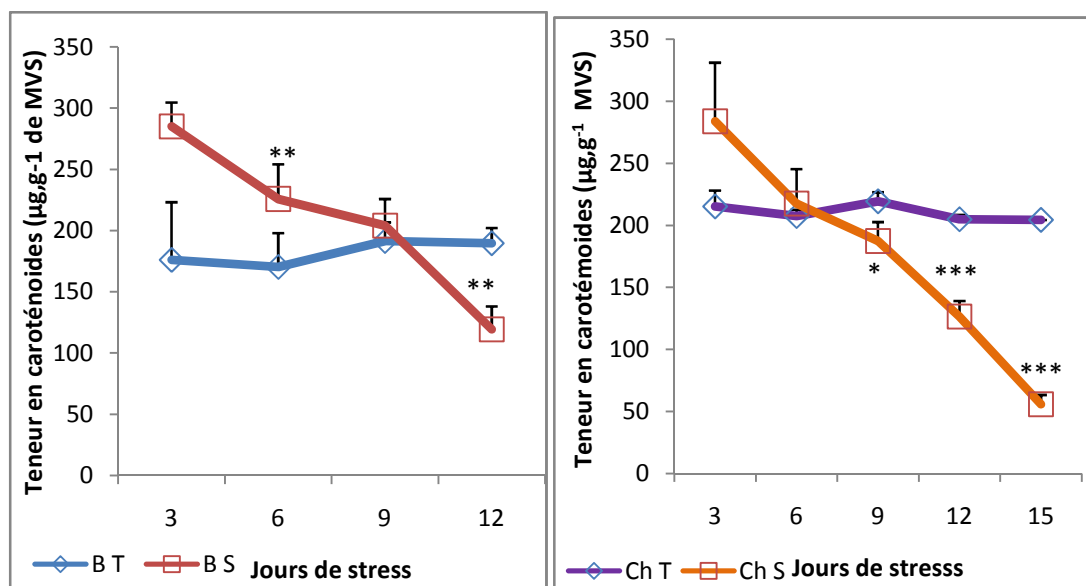


Figure 20 : effets du stress hydrique sur la teneur en caroténoïdes des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

* différence significative par rapport au témoin ($P=0.005$)

** différence très significative par rapport au témoin ($P=0.01$)

*** différence hautement significative par rapport au témoin ($P=0.001$)

IV.3.1.3- Le rapport chlorophylle a / chlorophylle b

Le rapport de la chlorophylle a/ chlorophylle b nous permet d'évaluer la sensibilité de la chlorophylle a et de la chlorophylle b, et donc le métabolisme des chlorophylles, vis-à-vis du déficit hydrique.

Tableau II : Effets du stress hydrique sur le rapport chl a/chl b des plantules des deux variétés de lentille âgées de 30 jours soumises à un arrêt d'arrosage de 15 jours.

Jours de stress	Balkan témoin	Balkan stressée	Champagne témoin	Champagne stressée
3	2,81±0,17	2,24±0,20	2,80±0,12	2,15±0,003
6	2,73±0,06	2,37±0,13	2,45±0,40	1,88±0,39
9	2,59±0,26	1,84±0,17	2,51±0,04	1,95±0,18
12	2,34±0,53	1,01±0,22	2,37±0,30	2,44±0,06
15	-	-	2,64±0,11	2,55±0,13

Les résultats illustrés par le tableau II montrent que chez les plantules témoins de la variété Balkan, le rapport chl a/chl b varie de 2,81±0,17 à 2,34 après 12 jours d'expérimentation. Chez les plantules stressées, ce rapport diminue avec l'intensification du stress atteignant une valeur de 1,01±0,22. Cette diminution du rapport chl a/chl b est liée à une plus forte diminution de la teneur en chlorophylle a. Cette diminution est significative avec un pourcentage de variation de -56,68%.

Chez la variété champagne, le rapport chl a/chl b est plus ou moins stable pendant toute la durée de l'expérimentation chez les plantules témoins. Chez les plantules stressées, une baisse du rapport est observée pendant la période allant de 6 à 9 jours d'arrêt d'arrosage ; par la suite le rapport augmente avoisinant ainsi celui des plantules témoin.

IV.3.2-Discussion

La quantité de chlorophylles des feuilles peut être influencée par beaucoup de facteurs liés à la plante (âge des feuilles et position des feuilles) et des facteurs environnementaux (lumière, température et disponibilité en eau) (Hikosaka *et al.*, 2006).

Nos résultats ont montré une diminution des teneurs en chlorophylles totales et en caroténoïdes chez les deux variétés lorsque le stress est sévère. Concernant les chlorophylles totales, au début du stress (3 jours d'arrêt d'arrosage), une augmentation est observée. Chez la variété Balkan 755 Amir, cette augmentation est de 50,99 % ; elle est de 53,51 % chez la variété Champagne.

Cette augmentation de la teneur en pigments a été observée chez plusieurs plantes stressées. Sestak et Vaclavik (1965) ont remarqué que la teneur en chlorophylles peut augmenter sous les conditions d'un déficit hydrique. Ainsi, García-Valenzuela *et al.* (2005) ont montré qu'une variété de *Bouteloua gracilis* (herbe très résistante au stress hydrique) développe une augmentation considérable de la teneur en chlorophylles (a et b) lors d'un traitement au PEG. Mouellef (2010) explique cette augmentation des teneurs en chlorophylles totales par la réduction de la taille des cellules foliaires sous l'effet d'un stress hydrique qui engendre une plus grande concentration.

Il est suggéré que les variétés résistantes au stress hydrique peuvent avoir une grande capacité de préserver leur appareil photosynthétique (Anderson et Aro, 1994; Loggini *et al.*, 1999). D'autres études montrent qu'au champ, la chlorophylle est assez

résistante à la sécheresse (Heckathorn *et al.*, 1997 ; Llorens *et al.*, 2003). La chlorophylle est ainsi en perpétuel équilibre entre synthèse et dégradation (Jacob-Wilk *et al.*, 1999). Réguler sa concentration, *via* la balance dégradation/synthèse, pourrait alors être un moyen pour les plantes de se protéger contre un excès d'énergie lumineuse en conditions de sécheresse.

Au-delà de 3 jours d'arrêt d'arrosage, une diminution de la teneur en chlorophylles totales est observée chez les deux variétés. Elle est de 27,14 % chez la variété Balkan et de 75,99 % chez la variété Champagne. De nombreuses études montrent une décroissance de la concentration en chlorophylles avec le stress hydrique (Munné-Bosch et Peñuelas, 2004, chez *Arbutus unedo* ; Bacelar *et al.*, 2006, chez *Olea europea*).

Smirnoff (1995) suppose que la diminution de la teneur en chlorophylles lors d'un stress hydrique peut être due aux dommages causés par les formes actives d'oxygène au niveau du chloroplaste. Une perte de chlorophylle pourrait ainsi être le signe d'un stress photooxydatif, ou plus probablement un mécanisme d'acclimatation (adaptation physiologique) de la machinerie photosynthétique.

IV.4- Effet du stress hydrique sur la teneur en sucres solubles

IV.4.1-Résultats et interprétations

Les sucres sont les éléments carbonés primaires synthétisés et exportés dans toute la plante lors de la photosynthèse ; ils peuvent aussi agir en tant qu'osmorégulateurs. La figure 21, représente les teneurs en sucres solubles chez les deux variétés.

Chez la variété Balkan 755 Amir, la valeur de la teneur en sucres solubles chez les plantules témoins est de $4,59 \pm 0,3$ mg.g⁻¹ de MVS, elle reste plus ou moins stable pendant la durée de l'expérimentation avec toutefois une légère augmentation à 9 jours (30.26 % par rapport au témoin).

Chez les plantules stressées, l'évolution de la teneur en sucres solubles suit celle des plantules témoins ; néanmoins cette teneur est réduite en moyenne de 20 % comparativement aux plantules témoins.

Pour les feuilles des plantules témoins de la variété champagne, la teneur en sucres solubles est relativement stable du 3^{ième} au 15^{ième} jour. Chez les plantules stressées, la teneur en sucres solubles est plus élevée que celle des plantules témoins entre 3 et 12 jours d'arrêt d'arrosage (3.79 mg.g⁻¹ MVS en moyenne); au-delà, la teneur en sucres solubles diminue de près de la moitié (49,38 % de réduction par rapport au témoin).

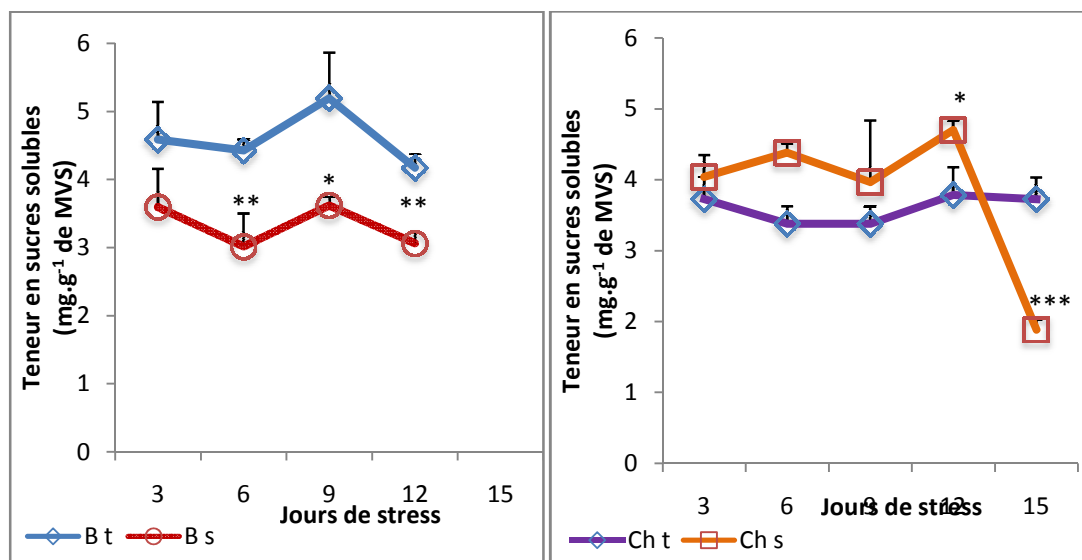


Figure 21 : Effets du stress hydrique sur la teneur en sucres solubles des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d’arrosage progressif de 3 à 15 jours.

* différence significative par rapport au témoin (P = 0.005)

** différence très significative par rapport au témoin (P = 0.01)

*** différence hautement significative par rapport au témoin (P = 0.001)

IV.4.2-Discussion

Chez les plantules de la variété Balkan, nous avons noté une réduction de la teneur en sucres solubles tout au long du stress. Cette diminution est d’environ 21%.

Chez la variété Champagne, la baisse de la teneur en sucres n’est observée qu’au 15^{ème} jour de stress alors que pendant la période de 3 à 12 jours d’arrêt d’arrosage une augmentation de la teneur en sucres éthanolosolubles est observée. Laouar *et al.* (1999) ont également observé une réduction de la quantité de sucres solubles chez quelques populations de *Medicago intertexta*. Cette chute est l’un des dommages observés chez les plantules stressées lors de la phase d’épuisement.

L’accumulation de sucres solubles au niveau de la plante entière, notamment de sa partie foliaire a également été observée par Kameli et Lösel (1995) et Rekika *et al.* (1998).

Le stress hydrique est connu pour altérer la répartition des assimilats entre les synthèses d’amidon et de saccharose, au profit du saccharose (Quick *et al.*, 1992 ; Bacelar *et al.*, 2006). Il s’accompagne également fréquemment d’une dégradation de l’amidon stocké. Ainsi, en conditions de stress hydrique, le pool d’amidon diminue et celui des sucres solubles augmente ou reste stable, en fonction de ce qui est consommé par la plante. La première réponse de la plante à un stress hydrique est une diminution de l’expansion cellulaire et, d’une manière générale, de l’activité puits. Elle se traduit par une diminution de l’exportation de saccharose et ainsi son accumulation dans les cellules de la feuille. Ce phénomène, largement étudié, est à l’origine d’une inhibition de la photosynthèse.

L'activité puits serait le régulateur de la photosynthèse : lorsque la production d'assimilats dépasse la demande par les puits, des gènes codant pour les enzymes de la photosynthèse seraient réprimés. Ainsi, la balance entre l'activité source et l'activité puits (relation sources-puits) serait maintenue.

Ces variations de concentration pourraient être liées au rôle osmoprotecteur des sucres solubles pendant la déshydratation des feuilles (Morgan, 1984 ; Chaves *et al.*, 2002), ou comme source de carbone, en particulier pour permettre la croissance lorsque l'état hydrique est restauré (Chaves *et al.*, 2002). En effet les sucres, même s'ils représentent des osmotica beaucoup moins puissants, participent également au maintien de la balance de l'équilibre osmotique pour garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevés que possible (Bouzoubaa *et al.*, 2001). Ils permettent également une préservation de l'intégrité membranaire dans les organes desséchés ainsi qu'une protection des protéines (Darbyshire, 1974).

IV.5- Effet du stress hydrique sur la teneur en proline

IV.5.1-Résultats et interprétations

La proline est un des solutés les plus stables et le plus distribué chez les plantules lors d'un stress. Les teneurs en proline des parties aériennes pour les deux variétés sont exprimées en mg^{-1}g de MVS. Les valeurs sont illustrées par la figure 22.

Les résultats obtenus montrent que sous l'effet du stress hydrique, la teneur en proline libre augmente chez les deux variétés.

Les feuilles des plantules témoins de la variété Balkan 755 Amir contiennent, en moyenne, une quantité de $0,014 \pm 0,006 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS de proline. Chez les plantules stressées, cette teneur est proche de celle des plantules témoins pendant les six jours d'arrêt d'arrosage. Lorsque le stress hydrique devient sévère (9 et 12 jours d'arrêt d'arrosage), cette teneur est respectivement de $0,13 \pm 0,029 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS et $0,334 \pm 0,079 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS soit 47 fois plus que celle du témoin.

Chez la variété Champagne, la teneur en proline augmente rapidement et de façon notable après 6 jours d'arrêt d'arrosage atteignant 24 fois la valeur de celle des plantules témoins d'arrosage après 12 jours de stress.

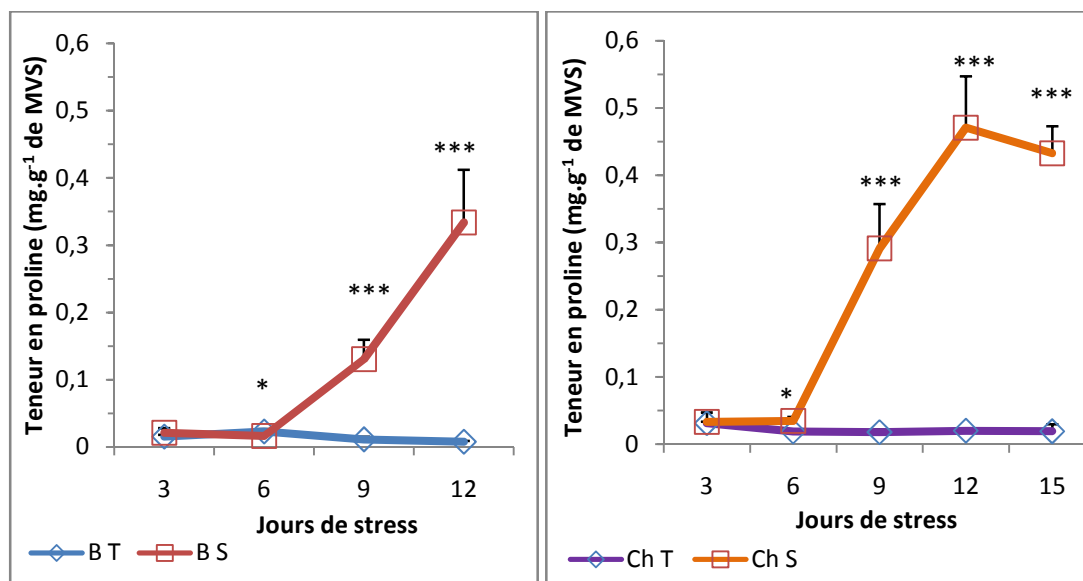


Figure 22 : Effets du stress hydrique sur la teneur en proline des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

* différence significative par rapport au témoin ($P=0.005$)

** différence très significative par rapport au témoin ($P= 0.01$)

*** différence hautement significative par rapport au témoin ($P=0.001$)

IV.5.2-Discussion

La relation entre le stress hydrique et l'accumulation de la proline est établie depuis longtemps.

Le dosage de la proline libre a montré que le stress hydrique a entraîné une grande accumulation de cette molécule chez les deux variétés étudiées.

L'augmentation de la synthèse *de novo* à partir du glutamate par stimulation de la glutamate déshydrogénase a été mise en évidence chez le haricot (Jager et Meyer, 1977). Plusieurs exemples montrent une modification de l'expression des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse d'osmolytes en réponse au déficit hydrique. Aussi, l'expression simultanée du gène de la P-5-C synthase (P-5-CS) et la répression du gène de la proline déshydrogénase (ProDH) conduit à une accumulation de proline pendant le déficit hydrique (Yoshida *et al.*, 1997). Quand le gène P-5-CS impliqué dans la synthèse de la proline a été introduit chez le riz, les plantes transgéniques ont montré une augmentation de biomasse dans des conditions de stress hydrique (Zhu *et al.*, 1998). Ces résultats renforcent l'hypothèse que l'accumulation de proline est susceptible d'augmenter la performance en réponse au stress hydrique.

L'augmentation de la teneur en proline observée peut être due en partie à l'augmentation de l'hydrolyse des protéines (Hubac et Viera Da Silva, 1980). En effet nous avons remarqué une diminution de la teneur en protéines totales chez les plantules des deux variétés de lentille sévèrement stressées.

L'inhibition de l'oxydation de la proline en hydroxyproline décrite chez l'orge (Stewart *et al.*, 1977) ou bien une diminution de son incorporation dans les protéines peuvent être, aussi, partiellement responsable de cette accumulation.

Un transporteur (LeProT1) de la proline a été également induit par le stress hydrique (Schwacke *et al.*, 1999). Ceci illustre la complexité du métabolisme permettant l'ajustement du niveau de proline.

IV.6- La teneur en protéines totales

IV.6.1-Résultats et interprétations

L'un des paramètres les plus étudiés chez les plantes soumises à un stress environnemental est la synthèse et la dégradation des protéines.

La teneur en protéines solubles évolue de la même façon chez les deux variétés (fig.23).

Chez les plantules stressées des deux variétés, la teneur en protéines solubles augmente progressivement jusqu'à atteindre une valeur maximale puis elle diminue.

Les plantules témoins de la variété Balkan 755 Amir présentent une teneur moyenne en protéines totales de $45.70 \pm 0,63 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS. Chez les plantules stressées, la teneur en protéines augmente de $53,07 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS au 3^{ème} jour d'arrêt d'arrosage à $73,62 \pm 4,67 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS après 6 jours d'arrêt d'arrosage. Lorsque le stress devient plus sévère cette valeur diminue à $44,55 \pm 1,24 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS se rapprochant ainsi de celle des plantules témoins.

Chez la variété Champagne, la teneur en protéines chez les plantules témoins est de $56,51 \pm 4,57 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS; celle-ci diminue légèrement au cours de l'expérience atteignant $50 \text{ mg}^{-1}\text{g}$ de MVS après 15 jours d'arrêt d'arrosage.

Chez les plantules stressées, la teneur en protéines totales est sensiblement égale à celle des plantules témoins entre 3 et 6 jours d'arrêt d'arrosage ; cette teneur s'élève à $62,95 \pm 16,08 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS après 9 jours d'arrêt d'arrosage soit une augmentation de 20,92 % par rapport au témoin, puis diminue à $20,22 \pm 0,32 \text{ mg.g}^{-1}$ de MVS chez les plantules sévèrement stressées soit 59 % de réduction par rapport aux plantules témoins.

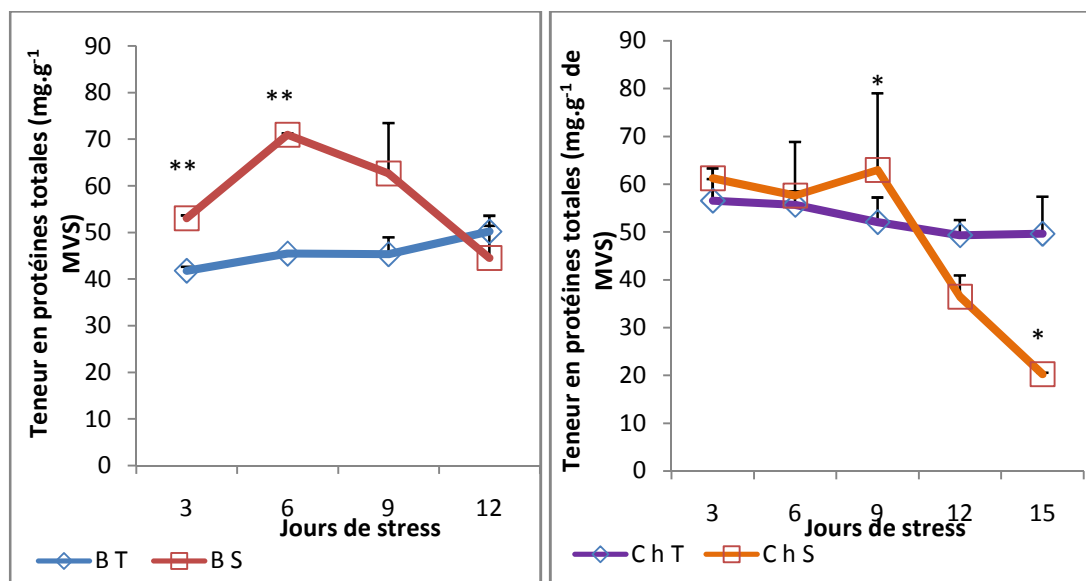


Figure 23 : Effets du stress hydrique sur la teneur en protéines totales des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

* différence significative par rapport au témoin ($P=0.005$)

** différence très significative par rapport au témoin ($P= 0.01$)

IV.6.2-Discussion

Chez la variété Balkan une augmentation de la teneur en protéines est observée pendant toute la durée du stress. Chez la variété Champagne, une augmentation de la quantité de protéines est observée pendant la première semaine puis une chute rapide et importante s'ensuit.

En plus du phénomène d'osmorégulation, les deux variétés de lentille ont répondu aux conditions de stress hydrique par une hausse dans le niveau de protéines totales au niveau des feuilles. Cette augmentation serait due à une activation d'un ensemble de gènes permettant la synthèse des protéines spécifiques associées aux stress telles que les protéines «LEA» qui assurent une protection de l'ensemble vital des protéines cellulaires (David et Grongnet, 2001), et les protéines de choc thermique (Hsp) qui permettent un maintien des structures protéiques et membranaires de la cellule végétale (Baker *et al.*, 1988).

Les changements dans le métabolisme des protéines au cours d'un stress environnemental peuvent être associés à une dégradation des protéines.

Le processus de la dégradation des protéines est généralement plus accéléré que leur synthèse par des contraintes environnementales ou pendant la sénescence des tissus naturels (Huffaker., 1990). La dégradation des protéines induite par le stress semble être relativement peu spécifique, impliquant de nombreuses enzymes (Cooke *et al.*, 1980).

La dégradation des protéines est effectuée par un ensemble de protéases, y compris les enzymes de la voie ubiquitine / protéasome et d'autres enzymes protéolytiques, tels que la cystéine protéase, sérine protéase et les métalloprotéases (Schaller, 2004).

En outre, le métabolisme azoté représente le facteur le plus important qui influence la croissance et les performances de la plante. La perturbation du métabolisme de l'azote sous conditions de déficit hydrique représente l'effet négatif le plus important. Certaines études ont montré une réduction de l'absorption de nitrates et une diminution de l'activité nitrate réductase sous stress hydrique.

IV.7- L'intégrité membranaire

IV.7.1-Résultats et interprétations

IV.7.1.1- la fuite relative d'électrolytes

Lors d'un stress, les membranes cellulaires peuvent être endommagées ; la mesure de la fuite relative d'électrolytes permet d'estimer le niveau des lésions membranaires.

Pour la variété Balkan 775 Amir, les résultats obtenus montrent une augmentation de la fuite relative d'électrolytes chez les plantules stressées ($33,68 \pm 3,36$ %) par rapport aux plantules témoins (29,93 %). Cette augmentation se fait de manière progressive au cours du stress. Le taux de variation est de 29,94 % par rapport au témoin après 12 jours d'arrêt d'arrosage (Fig.24).

Chez les feuilles des plantules témoins de la variété Champagne, la fuite d'électrolytes est estimée à 24,22 %. Cette fuite est plus importante chez les plantules stressées, elle passe à 61,97 % après 12 jours d'arrêt d'arrosage soit une augmentation de 71,19 %. Cette augmentation est plus importante que celle observée chez les plantules de la variété Balkan.

Chez la variété champagne, lorsque le stress hydrique devient très sévère (15 jours d'arrêt d'arrosage), les feuilles s'enroulent ce qui rend l'estimation de la fuite relative d'ions impossible.

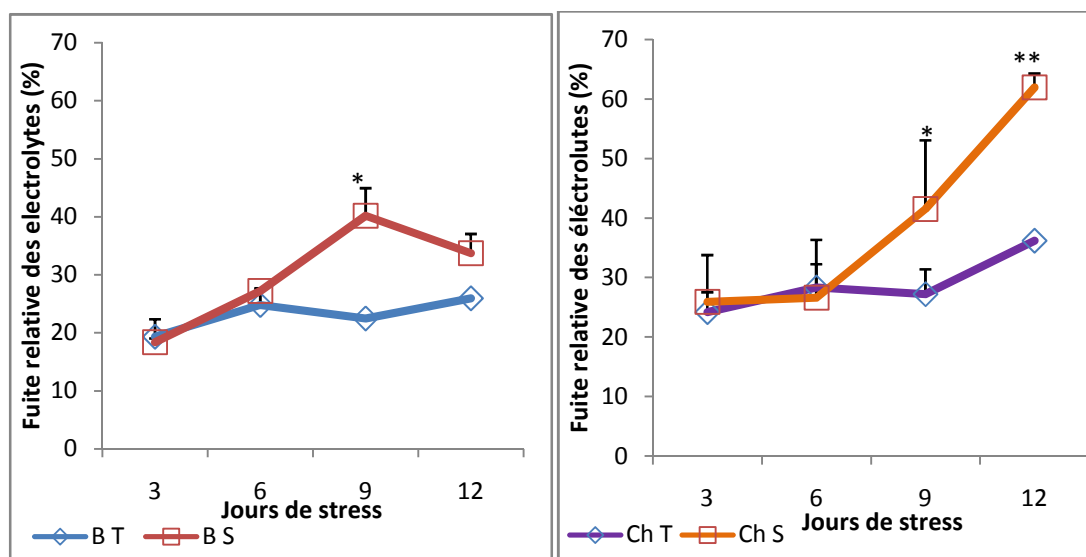


Figure 24 : Effets du stress hydrique sur la fuite relative d'électrolytes des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

* différence significative par rapport au témoin (P = 0.005)

** différence très significative par rapport au témoin (P = 0.01)

IV.7.1.2- Effet du stress hydrique sur la teneur en substances réactives à l'acide thiobarbiturique

Le dosage de la teneur en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (ex MDA) permet d'évaluer l'effet du stress oxydatif produit par le déficit hydrique sur les membranes cellulaires. Le MDA étant un des produits finaux de la peroxydation des acides gras polyinsaturés, il est considéré comme marqueur des dommages occasionnés aux lipides membranaires par les espèces actives d'oxygène (Smirnoff, 1993).

Pour la variété Balkan 755 Amir, la teneur en MDA des plantules stressées est moins importante comparativement aux plantules témoins néanmoins après 12 jours d'arrêt d'arrosage la teneur en MDA est sensiblement la même que celle des plantules témoins (Fig. 25).

Chez la variété Champagne, les plantules stressées présentent une augmentation de la teneur en substances réactives à l'acide thiobarbiturique par rapport à celle des plantules témoins. Cette teneur qui est de $7,75 \pm 0,67 \text{ nmole.g}^{-1}$ de MVS (identique chez les témoins et les stressées après 3 jours d'arrêt d'arrosage) augmente à $14,3 \text{ nmole.g}^{-1}$ de MVS après 15 jours d'arrêt d'arrosage soit un pourcentage de variation de 68,01 % par rapport aux plantules témoins.

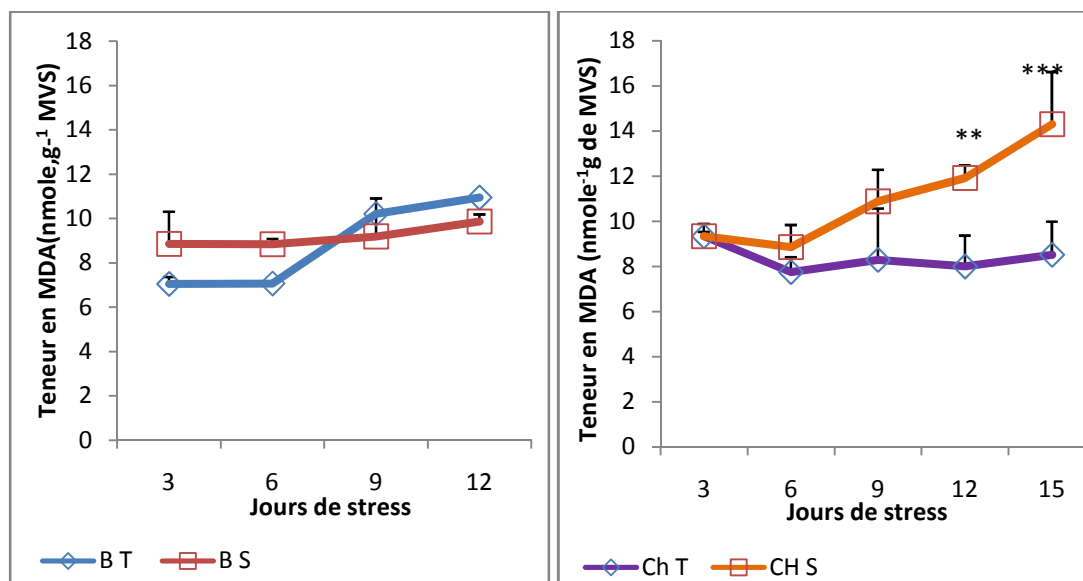


Figure 25 : Effets du stress hydrique sur la teneur en MDA des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

** différence très significative par rapport au témoin (P= 0.01)

*** différence hautement significative par rapport au témoin (P =0.001)

IV.7.2-Discussion

Il est admis que le stress hydrique est accompagné d'un stress oxydatif qui augmente la production des radicaux libres provoquant, ainsi, une peroxydation des lipides membranaires (Smirnov, 1993).

Dans notre cas nous avons remarqué chez la variété lentille de Champagne une augmentation de la teneur en MDA chez les plantules stressées (+ 78,56 % par rapport aux plantules témoins) ; mais chez les plantules stressées de la variété Balkan, cette augmentation n'est que de 16,48 % par rapport aux plantules témoins.

La peroxydation des lipides membranaires s'est produite par défaut de fonctionnement du système de détoxification (Monk *et al.*, 1989; Jiang et Huang, 2001). Une telle observation a été rapportée sous l'effet du déficit hydrique chez plusieurs espèces (Irigoyen *et al.*, 1992; Zhang et Kirkham, 1994; Jiang et Huang, 2001; Wang et Huang, 2004). Cependant, cette réponse n'est pas vérifiée chez *Hypericum brasiliense* puisque le MDA n'a pas augmenté de manière significative au niveau des tiges et des racines de ces plantes (Valentovic *et al.*, 2006).

Le degré de perméabilité de la membrane cellulaire peut être également estimé par conductimétrie. Nos résultats montrent que la fuite relative d'électrolytes notée chez les plantules stressées des deux variétés augmente de manière très significative à partir du 9^{ème} jour de d'arrêt d'arrosage. Cette augmentation est plus importante chez la variété Champagne (160,94 %) que chez la variété Balkan 775 (73,79 %) signe d'une instabilité membranaire.

L'augmentation de la fuite d'électrolytes est la conséquence d'une hausse de la diffusion passive à travers la bicouche phospholipidique membranaire lésée par la sécheresse et/ou d'une inactivation des protéines participant au transport actif des ions. El hafid et Belabed (1994) ont noté une variabilité dans la réponse membranaire au déficit hydrique chez deux variétés de soja (Harosoy et Adoc).

Sairam et Srivastava (2001) rapportent que les génotypes tolérants au stress chez le blé ont un bas niveau de peroxydation des lipides membranaire et un indice de stabilité membranaire élevé (MSI) par rapport aux génotypes sensibles. Sairam *et al.* (2002) et Bor *et al.* (2003) notent une corrélation entre l'augmentation de l'activité antioxydante et la diminution du taux de peroxydation des lipides membranaires chez les génotypes tolérants à la sécheresse chez le blé.

IV.8- Effet du stress hydrique sur les activités enzymatiques

IV.8.1-Résultats et interprétations

L'un des effets du stress hydrique au niveau cellulaire est le stress oxydatif qui résulte de l'augmentation de taux des formes actives d'oxygène (telles que le H_2O_2) qui peuvent provoquer des dommages au niveau de la cellule. Le système antioxydant intervient pour diminuer le taux des ROS.

Dans cette partie nous avons étudié les activités enzymatiques de la catalase et de l'ascorbate peroxydase non-chloroplastique qui interviennent dans la détoxification.

IV.8.1.1- L'activité catalase

Les résultats obtenus pour l'activité enzymatique de la catalase (Fig. 26) montrent que les deux variétés de lentilles réagissent de la même façon concernant l'activité enzymatique catalase : les deux variétés montrent une augmentation de l'activité catalase sous l'effet du stress.

Chez les plantules stressées de la variété Balkan, cette activité varie entre 73,08 nmole de $H_2O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de protéines après 3 jours à 61,72 nmoles de $H_2O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de protéines après 12 jours ce qui correspond à 78,46 % d'augmentation.

Chez la variété Champagne, l'activité enzymatique de la catalase chez les plantules stressées augmente progressivement par rapport à celle observée chez les plantules témoins jusqu'à atteindre une valeur maximale de 130,29 nmoles de $H_2O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de protéines après 15 jours de stress. Cette augmentation est 95,49 % par rapport aux plantules témoins (33,58 nmole de $H_2O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de protéines).

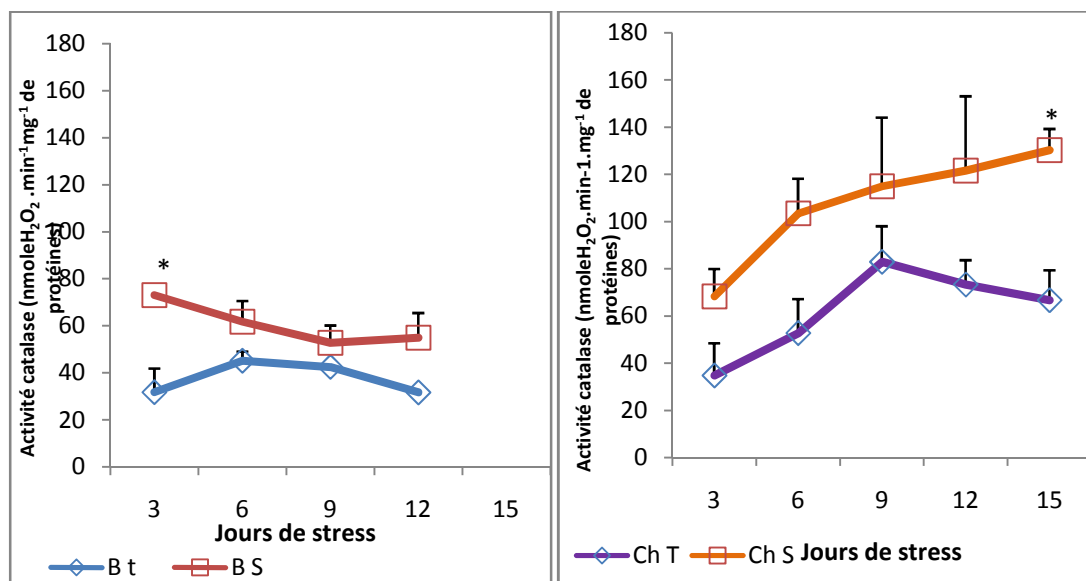


Figure 26 : Effets du stress hydrique sur l'activité enzymatique catalase des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

* différence significative par rapport au témoin ($P=0.005$)

IV.8.1.2- L'activité de l'ascorbate peroxydase

Les résultats obtenus pour l'activité enzymatique de l'ascorbate peroxydase (fig.27) montrent que les deux variétés de lentilles réagissent de la même façon concernant l'activité enzymatique APX : les deux variétés montrent une augmentation de l'activité ascorbate sous l'effet du stress (3 jours d'arrêt d'arrosage). Cette activité diminue lorsque le stress est plus sévère.

Chez les plantules témoins de la variété Balkan, l'activité ascorbate peroxydase est relativement stable pendant toute la durée de l'expérimentation : celle-ci varie de 389,06 nmoles. min⁻¹. mg⁻¹ de protéines à 432,28 nmoles d'ascorbate oxydé.min⁻¹. mg⁻¹ de protéines entre le début et la fin de l'expérimentation. Chez les plantules stressées, l'activité ascorbate peroxydase est de 720,93 μmole d'ascorbate oxydé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines après 3 jours (soit 85% d'augmentation par rapport au témoin), elle diminue à 433.18 nmoles d'ascorbate oxydé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines après 9 jours d'arrêt d'arrosage (valeur identique à celle du témoin) puis à 119.11 nmoles d'ascorbate oxydé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines soit 55% de diminution par rapport au témoin.

Chez la variété Champagne, l'activité APX des plantules témoins varie peu entre le 3^{ième} et le 9^{ième} jour de stress (263.22 nmoles d'ascorbate oxydé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines en moyenne) ; cette activité est doublée après 12 et 15 jours d'arrêt d'arrosage (584.73 nmoles d'ascorbate oxydé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines).

Chez les plantules stressées dès le troisième jour d'arrêt d'arrosage, l'APX est deux fois plus élevée sous l'effet du stress (764,13 nmoles d'ascorbate oxydé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines), elle diminue progressivement devenant plus faible que chez les plantules témoins après 12 et 15 jours d'arrêt d'arrosage.

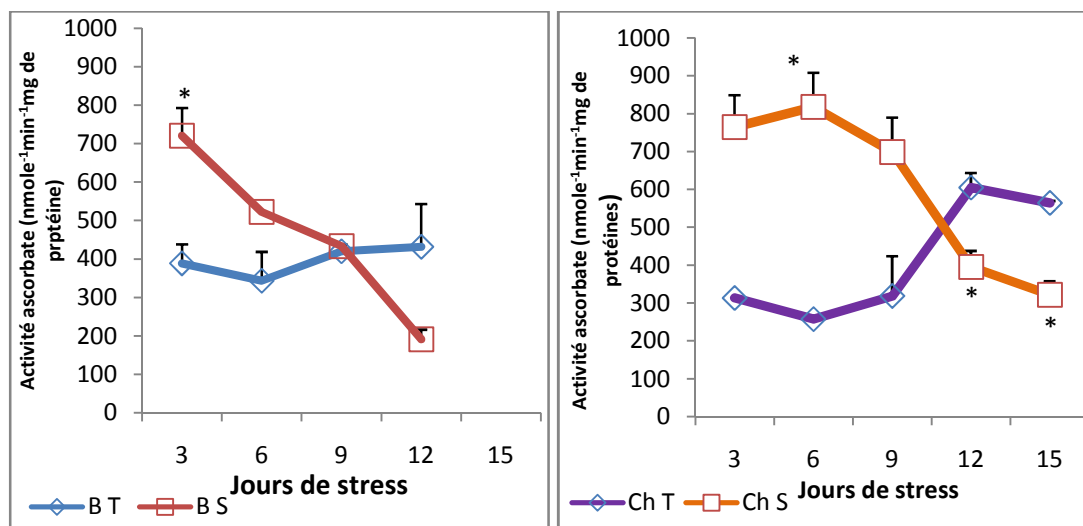


Figure 27: Effets du stress hydrique sur l'activité enzymatique ascorbate peroxydase des plantules des deux variétés de lentille âgées de 33 jours soumises à un arrêt d'arrosage progressif de 3 à 15 jours.

* différence significative par rapport au témoin (P =0.005)

IV.8.2-Discussion

Pour contrer les effets délétères du stress oxydatif, la plante dispose de tout un arsenal de systèmes antioxydatifs dont la catalase et l'ascorbate peroxydase.

Des hautes activités des enzymes antioxydantes améliorent la tolérance à la sécheresse de cultivars de mûrier (Reddy *et al.*, 2004), de thé (Upadhyaya *et al.*, 2008) et d'olivier (Ben Ahmed *et al.*, 2009).

Nos résultats (augmentation des activités des deux enzymes) sont en accord avec les résultats obtenus par Reddy *et al.* (2004) et Türkan *et al.* (2005) qui ont trouvé un taux élevé de l'activité de la CAT chez les variétés tolérantes au stress hydrique. L'APX et d'autres enzymes antioxydantes jouent un rôle dans le maintien de faibles niveaux de H₂O₂ chez le blé cultivé tolérant à la sécheresse (Zhang et Kirkham, 1994).

Diverses réponses des activités de CAT au déficit hydrique sont rapportées. Certaines études ont observé que le stress hydrique engendre des activités élevées de la catalase (Bueno *et al.*, 1998 ; Luna *et al.*, 2004). Dans d'autres études, l'activité catalase a diminué (Quartacci et Navari-Izzo, 1992; Zhang et Kirkham, 1994; Jiang et Huang, 2001). La diminution de l'activité CAT pourrait être attribuée à sa photo-inactivation (Feierabend et Engel, 1986; Polle, 1997). L'inhibition de la synthèse des protéines induite par le stress hydrique (Badiani *et al.*, 1990) explique en partie la diminution marquée de l'activité de CAT à la lumière chez des plantes soumises à un stress hydrique (Zhang et Kirkham, 1994).

Sharma et Dubey (2005) ont rapporté une diminution de H₂O₂ concomitante à une augmentation des activités de la SOD et APX chez les plantules de riz soumises à un stress hydrique.

Chez un clone de *Coffea Canephora* résistant à la sécheresse, les activités de la catalase et peroxydase augmentent beaucoup plus que dans le clone sensible (Lima *et al.*, 2002) ; cette augmentation d'activité enzymatique antioxydante est traduite par des niveaux bas de la peroxydation des lipides et de la fuite d'électrolytes.

La variété *Phaseolus acutifolius* résistante à la sécheresse, révèle également des hauts niveaux des activités CAT, SOD, POD et APX, et des niveaux bas concernant la peroxydation des lipides comparés à *Phaseolus vulgare* sensible à la sécheresse (Turkan *et al.*, 2005).

IV.9- Effet du stress hydrique sur le profil électrophorétique des deux variétés

IV.9.1-Résultats et interprétations

Les profils des protéines totales des feuilles des deux variétés de lentille étudiées, obtenus par SDS-PAGE révèlent des variations entre les plantules témoins et les plantules stressées (fig. 28 et fig. 29). Les différences se manifestent par des variations dans l'intensité de certaines bandes et l'apparition ou la disparition d'autres bandes.

Concernant le profil électrophorétique des protéines de la variété Balkan 775 Amir (fig. 28), nous remarquons que les bandes correspondant aux grosses sous-unités de la Rubisco sont bien présentes. Au cours du stress, nous remarquons que l'intensité des bandes diminue au fur à mesure que le stress s'intensifie.

Par ailleurs, nous remarquons l'apparition de bandes de protéines chez les plantules stressées à la fin du stress (de 9 à 12 jours d'arrêt d'arrosage). Ces bandes ont un poids moléculaire d'environ 60 kDa. Une deuxième bande d'environ 30 kDa apparaît au 12^{ème} jour chez les plantules stressées.

Chez la variété Champagne, nous avons remarqué l'apparition d'une bande d'environ 30 kDa chez les plantules sévèrement stressées (15 jours d'arrêt d'arrosage) (fig. 29). A partir du 12^{ème} jour après arrêt d'arrosage, le profil électrophorétique des plantules stressées est marqué par la disparition d'une bande protéique dont le PM correspond à environ 54 kDa).

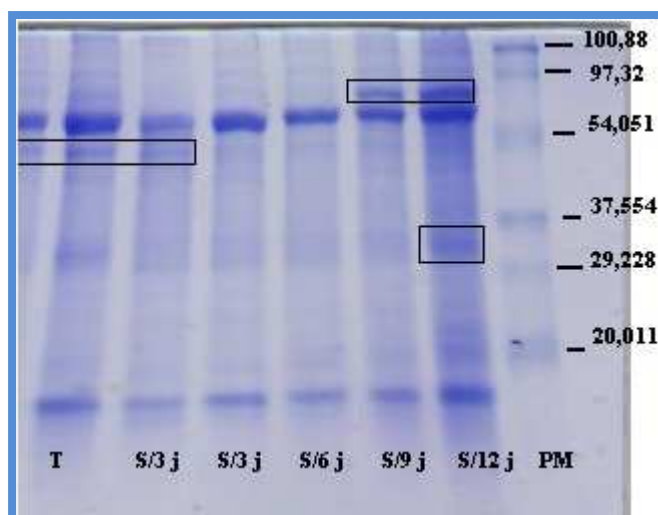


Figure 28 : Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines totales des feuilles de la variété Balkan 775 Amir chez les plantules témoins et stressées âgées de 33 jours.

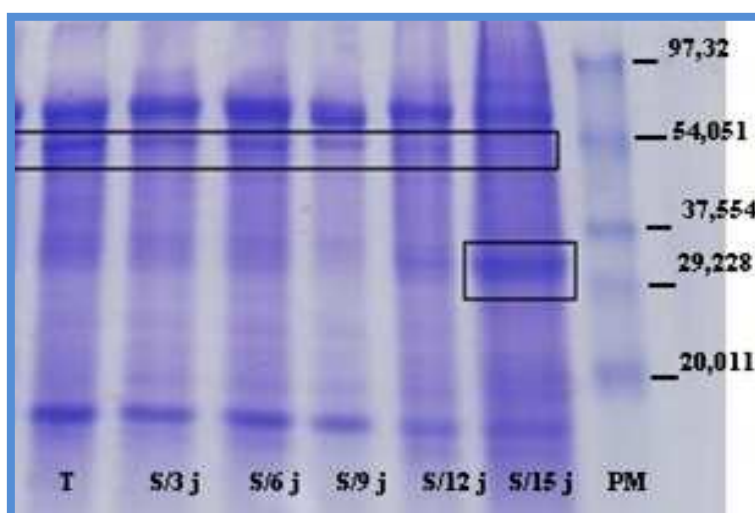


Figure 29 : Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines totales des feuilles de la variété Champagne chez les plantules témoins et stressées âgées de 33 jours.

IV.9.2-Discussion

Il est évident que le stress hydrique provoque des changements significatifs au niveau de la composition protéique. Dans la dernière partie de notre travail, nous avons essayé d'étudier la composition protéique des plantules par la technique d'électrophorèse SDS-PAGE. Dans cette partie de travail nous avons constaté qu'une protéine d'un PM d'environ 30 kDa apparait chez les deux variétés. Nous supposons que cette protéine correspond à une protéine chloroplastique. Des travaux réalisés par Huseynova *et al.*, 2010 ont mis en évidence cette protéine chez des plantules tressées. D'après Rey *et al.* (1998), une protéine stromatique de 32 kDa apparenté à la thioredixine est supposée maintenir l'état redox des protéines chloroplastiques sous des conditions de stress hydrique.

Nous avons aussi constaté l'apparition d'une bande de protéine d'environ 60 kDa chez les plantules stressées de la variété Balkan. Nous supposons que cette bande de protéine correspondrait à une dehydrine (CPA 60).

Les dehydrines sont des protéines induites par des stress environnementaux qui provoquent une déshydratation des cellules (Close, 1997). Huseynova *et al.*, (2010), ont trouvé que l'intensité d'une protéine de 60 kDa augmente chez les génotypes résistants. L'expression saisonnière de ce polypeptide a été rapportée chez plusieurs espèces (Wisnewski *et al.*, 1999).

Tous ces groupes de protéines sont caractérisés par une grande capacité hydrophobique. Durant une déshydratation des cellules ces protéines empêchent la perte d'eau due à leur capacité hydrophobique stabilisant ainsi les protéines cellulaires.

Conclusion

V- Conclusion

Le travail entrepris a pour but de comprendre les réponses de deux variétés de lentille à une contrainte hydrique.

Les résultats obtenus dans le cadre de nos expérimentations nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

Sous l'effet d'un arrêt d'arrosage, la teneur relative en eau des plantules des deux variétés diminue ce qui traduit l'installation d'une sécheresse physiologique. Cette diminution est d'autant plus importante que l'intensité du stress est plus accentuée (à partir de 9 jours d'arrêt d'arrosage). La durée du stress supportée par la variété Balkan n'est que de 12 jours alors que pour la variété Champagne cette durée va jusqu'à 15 jours après arrêt d'arrosage.

Du point de vue morphologique, les plantules stressées des deux variétés de *Lens culinaris L* apparaissent plus petites par rapport aux plantules témoins. Cette réduction de taille est un des effets du stress hydrique sur les plantules. D'après Wang *et al.*, (2003) les stress environnementaux, notamment le stress hydrique, limitent sérieusement la croissance des plantes ainsi que la productivité végétale. Cependant, Lawlor et Cornic (2002) supposent que les plantes sont capables de modifier de nombreux aspects de leur développement (diminution de la croissance) et/ou de leur physiologie de manière à mieux s'adapter aux conditions défavorables.

Le stress hydrique induit généralement un stress oxydatif entraînant des dommages à l'échelle cellulaire. Nos résultats ont montré une diminution des pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) chez les deux variétés liés à l'installation du stress oxydatif. Au niveau membranaire, la variété Balkan, ne semble pas être affectée dans la mesure où le niveau de MDA et celui de la fuite relative des électrolytes sont sensiblement identiques à ceux des plantules témoins. Par contre, chez la variété Champagne, l'intégrité membranaire semble endommagée par le stress hydrique vue l'augmentation de la fuite relative des électrolytes et celle de la quantité de MDA comparativement avec les plantules témoins.

Pour faire face aux conditions de stress, les deux variétés ont édifié des mécanismes d'adaptation. Ainsi, pour garder le potentiel de turgescence aussi élevé que possible, après la baisse de la disponibilité en eau, les deux variétés ont accumulé certains osmotica dont la proline.

En général, la proline est connue pour son rôle dans l'ajustement osmotique lors d'un stress hydrique et/ ou pour constituer une source de carbone et d'azote. Cependant, de nombreuses études ont rapporté un rôle protecteur de la proline contre les dommages causés par les formes actives d'oxygène (Ozgur *et al.*, 2008).

Chez la variété Balkan, la proline semble jouer le rôle d'osmotica et de protecteur. Par contre, chez la variété Champagne, le rôle de la proline semble limité à l'ajustement osmotique.

Les résultats obtenus montrent une relation, entre les teneurs en proline accumulées et les quantités en pigments chlorophylliens perdues par chacune des deux variétés. Ces

résultats suggèrent l'existence d'une connexion vraisemblable entre les voies de biosynthèse des pigments chlorophylliens et de la proline. Une compétition entre ces deux composés pour leur précurseur commun, le glutamate, peut être à l'origine de cette évolution (Bengston *et al.*, 1978 ; Reddy et Veeranjanyulu, 1991).

Concernant la teneur en sucres solubles, les plantules des deux variétés réagissent différemment à la déshydratation. Chez les plantules de la variété Balkan, dès 3 jours d'arrêt d'arrosage, la teneur en sucres solubles diminue chez les plantules stressées par rapport aux plantules témoins. Ceci traduirait une réduction de l'activité photosynthétique liée en partie à la diminution en chlorophylles et en caroténoïdes enregistrée chez cette variété. Par ailleurs, l'utilisation des sucres dans les processus énergétiques nécessaires à la croissance et au système de soutien général des plantules pourrait également expliquer leur réduction.

Par contre, chez la variété Champagne, la teneur en sucres solubles augmente dans les feuilles des plantules stressées (à partir de 3 jours d'arrêt d'arrosage). Cette accumulation de sucres pourrait être impliquée dans l'ajustement osmotique. Ainsi, les enzymes liées au métabolisme des sucres semblent avoir une importance majeure dans la tolérance au stress hydrique. L'implication des sucres dans la réponse au stress hydrique a été mise en évidence de par les corrélations observées entre le contenu en certains sucres et l'acquisition de la tolérance. Ces corrélations ont été observées chez les animaux, les plantes, les levures et les bactéries (Gorham *et al.* 1981).

Afin de contrer les effets délétères du stress oxydatif accompagnant le stress hydrique, la plante dispose de mécanismes antioxydatifs. Chez les deux variétés de lentille stressées, nous avons montré une augmentation des activités de la catalase et de l'ascorbate peroxydase. Ceci expliquerait en partie le faible niveau de dommages membranaires chez la variété Balkan. Par contre, chez la variété Champagne et malgré l'augmentation des activités des deux enzymes, cela ne semble pas suffire à baisser le niveau des molécules actives d'oxygène au vu des quantités de MDA et de la fuite des électrolytes.

La modification du métabolisme en réponse au stress implique nécessairement une modification de l'expression des gènes aboutissant à la synthèse de nouvelles protéines dites « protéines de stress ». Les voies de biosynthèse sont ainsi réorientées vers l'élaboration de protéines de protection ou de réparation : thiorédoxines, déhydrines, LEA, capables de se lier aux protéines instables pour prévenir les phénomènes de dénaturation et d'agrégation et promouvoir leur renaturation.

Sous l'effet du stress hydrique, une protéine d'une trentaine de kDa a été mise en évidence chez les deux variétés. Elle serait apparentée aux thiorédoxines (Rey *et al.*, 2005) supposée maintenir l'état redox des protéines chloroplastiques en conditions de stress. Chez la variété Balkan, nous avons remarqué l'apparition d'une autre protéine de 60 kDa que nous supposons être une déhydrine, protéine de type LEA, participant au maintien de la stabilité membranaire.

Le déficit hydrique induit un grand nombre de fonctions impliquées dans les réponses des deux variétés de lentille.

Nos observations ont montré que pour les différents paramètres étudiés, les deux variétés ne réagissent pas de la même façon vis-à-vis du stress :

- ✓ Du point de vue morphologique, la taille de la partie aérienne des plantules stressées de la variété Balkan est plus petite que celle des plantules stressées de la variété Champagne.
- ✓ Réduction avec la même intensité de la teneur en pigments photosynthétiques chez les deux variétés.
- ✓ Augmentation de la teneur en sucres chez la variété Champagne, et diminution chez la variété Balkan.
- ✓ Accumulation plus importante de la proline chez la variété Champagne.
- ✓ Augmentation du MDA et de la fuite des électrolytes chez la variété Champagne et faibles variations chez la variété Balkan.
- ✓ Augmentation des activités enzymatiques de la catalase et de l'ascorbate peroxydase, plus importante chez la variété Champagne que chez la variété Balkan.
- ✓ Apparition chez la variété Balkan, d'une nouvelle protéine (non détectée chez la variété Champagne) qui semblerait participer au maintien de la stabilité membranaire.

A l'issue du travail réalisé sur les deux variétés nous pouvons conclure que la variété Champagne supporte plus longtemps la contrainte hydrique (15 jours contre 12 jours pour la variété Balkan). Toutefois et compte tenu des divers paramètres étudiés, la variété Balkan semble mieux supporter la contrainte hydrique. Néanmoins, la capacité des plantes à survivre et se développer en situation de stress abiotique est un caractère complexe et polygénique, ayant pour origine de nombreux processus agissant de façon additive et synergique.

Ainsi, pour appréciation plus complète de l'effet de la contrainte hydrique sur les plantules des deux variétés de *Lens culinaris L*, il serait intéressant de compléter et d'enrichir ce travail par :

- Une étude histologique au niveau racinaire et foliaire.
- Un dosage d'autres antioxydants impliqués dans le système de détoxification tels que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, le glutathion l'ascorbate et l'alpha tocophérol.
- Un dosage d'autres solutés tels que la glycine bétaine.
- Une étude plus approfondie des protéines nouvellement apparues.

*Références
bibliographiques*

- Albouchi A., Ghris R., EL Aouni MH. (1997).** Endurcissement à la sécheresse et accumulation de glucides solubles et d'acides aminés libres dans le phylloides d'*Acacia cyanophylla*.lindl. *Ann Sci.* **54** : 215-223.
- Alexandersson E., Fraysse L., Sjövall-Larsen S., Gustavsson S., Fellert M., et al. (2005).** Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology.* **59**: 469–484.
- Alscher R G., Erturk N., Heath L. S. (2002).** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Exp. Bot.* **53**: 1331-1341.
- Alscher R.G., Erturk N., Heath L. S. (2002).** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Exp. Bot.* **53**: 1331-1341.
- Anderson, J M. et Aro E M. (1994).** Grana stacking and protection of Photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: an hypothesis. *Photosynth. Res.* **41**:315–326.
- Appel K. et Hirt H. (2004).** Reactive oxygen species : metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373-399.
- Aroca R. Vernieri P. Irigoyen J. J. Sánchez-Díaz M. Tognoni F. Pardossi A. (2003).** Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Science* 165:671-679.
- Asada K, Takahashi M. (1987).** Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, *Photoinhibition. Elsevier, Amsterdam.* 227–287
- Asada K. (1999).** The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 601–639.
- Attia F, (2007).** Effet du stress hydrique sur le comportement écophysologique et la maturité phénologique de la vigne (*Vitis vinifera* L.) : Etude de cinq cépages autochtones de Midi-Pyrénées. Thèse INP, Toulouse (France), 194p.
- Bacelar EA., Santos DL., Moutinho-Pereira JM., Gonçalves BC., Ferreira HF., Correia CM. (2006).** Immediate responses and adaptive strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science.* **170**: 596-605.
- Badiani M., De Biasi MG., Colognola M., Artemi F. (1990).** Catalase, peroxidase and superoxide dismutase activities in seedlings submitted to increasing water deficit. *Agrochimica.* **30**: 90-102.
- Baker J., Steel C.H. et Dure I.L. (1988).** Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* **11**: 277-291.

- Bartels D. et Sunkar R. (2005).** Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **24**:23–58.
- Bélaygue C., Wery J., Cowan A.A., Tardieu F., (1996).** How do Leaf Expansion, Rate of Leaf Appearance and Stolon Branching Contribute to Plant Leaf Area Establishment under Water Deficit in White Clover (*Trifolium repens L.*). *Crop Science*. **36**: 1240-1246.
- Ben Ahmed C., Ben Rouina B., Sensoy S., Boukhris M., Ben Abdallah F. (2009).** Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environ. Exp. Bot.* **67**: 345–352.
- Benov L., Georgiev N. (1994).** The antioxidant activity of flavonoids isolated from *Corylus colurna*. *Phytotherapy Research*. **8**: 92-94.
- Bensari M. (1989).** Répartition du carbone photosynthétique entre le saccharose et l'amidon dans les feuilles de Soja. Influence d'un déficit hydrique. *Thèse de doctorat d'Etat, université de Constantine, Algérie*, 86 pages.
- Bianchi G., Gamba A., Murellie C., Salamini F. et Bartels D. (1991).** Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant J.* **1**:355-359.
- Blum A., Ebercon A. (1981)** CeU membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.* **21**: 43-47.
- Bogges S F , Aspinall D. , Paleg L G. (1976).** Stress metabolism. IX. The significance of endproduct inhibition of proline synthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. *Aust. J. Plant Physiol.* **3**: 513-525.
- Bonhert HJ., Sheveleva E. (1998).** Plant stress adaptations- making metabolism move *Current Opinion in Plant Biology.* **1**: 267-274.
- Bor, M., Özdemir F. et I. Türkan. (2003).** The effect of salt stress on lipid per-oxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris L.* and wild beet *Beta maritima L.* *Pl. Sci.* **164**: 77–84.
- Bouchabke O., Tardieu F. and T. Simonneau. (2006).** Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays L.*) respond to evaporative demand in well-watered but not in water saturated soil. *Plant Cell & Environment*. **29**:1138-1148.
- Boudsocq M. et Lauriere C. (2005).** Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol.* **138**: 1185-1194.
- Boursiac Y., Chen S., Luu DT., Sorieul M., Van den Dries N. et al. (2005).** Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology.* **139** : 790–805.
- Bouzoubaa Z., El Mourid M., Karrou M. et El Gharous M. (2001).** Manuel d'analyse chimique et biochimique des plantes. *Eds INRA Maroc*.

- Boveris A., Cadenas E., stoppani A O M. (1976).** Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* **156**: 435-444.
- Bowler C., Slooten L., Vandenbranden S., De Rycke R., Botterman J., Sybesma C., Van Montagu M. et Inze´ , D. (1991).** Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* **10** : 1723–1732.
- Boyer J. (1982).** Les sols ferrallitiques. Facteurs de fertilité et utilisation des sols, Tome X. Paris, Orstom, I.D.T. 52: 384 p.
- Boyer J. S. (1982).** Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Bradford MM. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248–254.
- Braidot E., Petrusa E., Vianello A. et Macri F. (1999).** Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Letters.* **451**.347-350.
- Bray E. A. (1997).** Plant responses to water deficit. *Plant science*, **2**: 48-54.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. (2000).** Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W, Buchannan B, Jones R, editors. *Biochemistry and molecular biology of plants.* Rockville, MD: *American Society of Plant Physiologists.* p. 1158–1249.
- Broin M., Cuine S., Peltier G. et Rey P. (2000).** Involvement of CDSP32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS Lett.* **467**: 245–248.
- Brown P. W. et Tanner C. B. (1983).** Alfalfa stem and leaf growth during water stress. *Agro. J.* **75**: 799-804.
- Bueno P., Piqueras A., Kurepa J., Savoure´ A., Verbruggen N., Van Montagu M., Inze´ D. (1998).** Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Sci.* **138**: 27–34
- Castrillo H. et Trujillo I. (1992).** Ribulose 1-5, bisphosphate carboxylase activity, chlorophyll and protéins content. *Journal of Experimental Botany.* **43**: 1557-1561.
- Chance B., Sies H. et Boveris A. (1979).** Hyperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Review.* **59**: 527-605.
- Chaves M.M., Maroco J.P. et Pereira, J.S. (2003).** - Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology.* **30** : 239-264.
- Chaves MM., Pereira JS., Maroco J., Rodrigues ML., Ricardo CPP., Oso´rio ML., et al. (2002).** How plants cope with water stress in the field: photosynthesis and growth. *Annals of Botany.* **89**: 907–916.

- Chini A., Grant J J., Seki M., Shinozaki K. et Loake GJ. (2004).** Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*. **38** : 810–22.
- Clarke J. M. and McCaig T.M. (1982).** Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop. Sci.*, 22:1036-1040.
- Close T.J. (1997).** Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.* **100**: 291-296.
- Cook A.G., Critchley B.R., Critchley U., Perfect T.J., Yeadon R. (1980).** Effects of cultivation and DDT on earthworm activity in a forest soil in the sub-humid tropics. *J. Appl. Ecol.* **17**: 21–29.
- Corpas FJ., Barroso JB. et del Rio LA. (2001).** Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**: 145-150.
- Cosgrove D.J. (2005).** Growth of the cell wall. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **6**:850-861.
- Courtois B., McLaren G., Sinha P.K., Prasad K., Yadav R. et Shen L. (2000).** Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice. *Molecular Breeding*. **6**: 55-66.
- Creelman RA., Masson HS., Bensen RJ., Boyer JS et Hullett JE. (1990).** Water deficit and abscissic acid cause differential inhibition shoot versus root growth in soy bean seedlings. *Plant Physiol.* **92**: 205-214.
- Darbyshire B. (1974).** The function of the carbohydrate units of tree fungal enzymes in their resistance to dehydration. *Plant Physiol.* **54**: 717-721.
- David J.C. et Grongnet J.F. (2001).** Les protéines de stress. *INRA Prod. Anim.* **14**: 29-40.
- Davis WJ., Tardieu F. et Trejo CL. (1994)** How do chemical signals works in plants that grow in drying soil. *Plant Physiol.* **104**: 309–314.
- De Ronde J.A., Spreeth M.H. et Cress W.A. (2000).** Effect of antisense L- Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. *Plant Growth Regul.* **32**: 13-26.
- Dejardin A., Sokolov L.N. et Kleczkowski L.A. (1999).** Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in Arabidopsis. *Biochemical Journal.* **344**: 503-509.
- Delgado E., Parry M A J ., Vadell J., Lawlord W., Keys A J. et Madranc H. (1992).** Effect of water stress on photosynthesis, leaf characteristic and productivity of field grown of *Nicotiana tabacum* genotype selected for survival at low CO₂. *Journal of Experimental Botany.* **43** : 1001-1008.

- Demmig-Adams B. et Adams W. W. (1993).** The xanthophyll cycle. In *Antioxidants in Higher Plants*, R.G. Alscher and J.L. Hess, eds (London: CRC Press), pp. 91-110.
- Demmig-Adams B. et Adams WW. (1992).** Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants with different life forms. *Plant Cell Environ.* **15**:411-419.
- Dionisio-Sese ML. et Tobita S. (1998).** Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* **135**: 1-9.
- Djebbar R. (1996).** Définir la terminologie concernant les relations plante –eau. 4ème journées scientifiques de L’U R B F A, du 19 au 20/03/1996, USTHB, Alger.
- Djebbar R. (1991).** Effet d’un stress hydrique sur la fructification et le métabolisme lipidique de graines de Soja en développement. *Thèse de magister, USTHB, Alger.*
- Duffus C.M. et Ibinnie J. (1990).** Sucrose Relationship during endosperm and embryo development in wheat. *Plant physiol. Bioch.* **28** :161-165.
- Dugo MVG. (2002).** Effet du déficit hydrique sur l’état de nutrition azotée chez les graminées fourragères. *Thèse Université de Poitiers* (France), 189 p.
- El Hafid L. et Belabed A. (1994).** Relations entre la résistance membranaire et la composition en lipides foliaires sous l’effet d’un stress hydrique chez deux variétés de Soja. *Actes Inst. Agron. Veto (Maroc).* **14** : 41–46.
- El Mourid M. (1988).** Performance of wheat and barley cultivars under different soil moisture regimes in semi arid region. Ph.D. dissertation, Iowa State University Ames USA, 229 p.
- Feder M.E. et Hofmann G.E. (1999).** Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones, and stress response : Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **61**: 243–82.
- Feierabend J. et Engel S. (1986).** Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **251**: 567-576.
- Flexas J., Bota J., Galmés J., Medrano H. et Ribas-Carbó M. (2006).** Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum.* **127**:343-352.
- Foyer C.H. et Halliwell B. (1976).** The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* **133**: 21-25.
- Foyer CH. et Noctor G. (2003).** Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum.* **119**: 355-364.
- Foyer, C.H., and G. Noctor. (2000).** Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist.* **146**:359-388.

- Frugoli JA., Zhong HH., Nuccio ML., McCourt P., McPeck MA., Thomas TL. et McClung CR. (1996).** Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Plant Physiology*. **112**: 327-336.
- Gahoonia TS., Raza S. et Nielsen NE. (1994).** Phosphorus depletion in the rhizosphere as influenced by soil moisture. *Plant and Soil*. **159**: 213-218.
- García-Valenzuela X., García-Moya E., Rascón-Cruz Q., Herrera-Estrella L. et Aguado-Santacruz G.A. (2005).** Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *J. Pl. Physiol.* **162**: 650–61.
- Geigenberger P., Reimholz R., Deiting U., Sonnewald U. et Stitt M. (1999).** Decreased expression of sucrose phosphate synthase strongly inhibits the water stress-induced synthesis of sucrose in growing potato tubers. *Plant Journal*. **19**: 119-129.
- Gimenez C., Mitchell V.J. et Lawlor D.W. (1992).** Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiol.* **98**:516-524.
- Gorham J., Hughes L.I. et Wyn Jones R.G. (1981).** *Physiol. Plant*, **53**, 27-33.
- Gosse G., Chartier M. et Lemaire G. (1984).** Mise au point d'un modèle de prévision de production pour une culture de luzerne. *C.R. Acad. Sci. Ser. Ili Sci. Vie* **298**, 541-544.
- Gould S.A., Moore E.E., Hoyt D.B. et al. (2002).** The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable. *Journal of the American College of Surgeons*. **195**: 445–455.
- Graam T. et Boyer JS. (1990).** Very high CO₂ partially restores photosynthesis in sunflower at low water potentials. *Planta*. **181**: 378–384.
- Graam T. et Boyer JS. (1990).** Very high CO₂ partially restores photosynthesis in sunflower at low water potentials. *Planta*. **181**: 378-384.
- Granier C., Inzé D. et F. Tardieu. (2000).** Spatial distribution cell division rate can be deduced from that of P34cdc2 kinase activity in maize leaves grown in contrasting conditions of temperature and water status. *Plant Physiol.* **124**:1393-1402.
- Grelet J., Benamar A., Teyssier E., Avelange-Macherel M-H.,Grunwald D., Macherel D. (2005).** Identification in pea seedmitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.* **137**:157–167.
- Gupta S.A. et Berkowitz G.A. (1987).** Osmotic adjustment, symplast volume, and nonstomatally mediated water stress inhibition of photosynthesis in wheat. *Plant Physiol.* **87**:1040–1047.
- Gupta S.A. et G.A. Berkowitz. (1987).** Osmotic adjustment, symplast volume, and nonstomatally mediated water stress inhibition of photosynthesis in wheat. *Plant Physiol.* **87**:1040–1047.

- Gurley W.B. (2000).** HSP101: A Key Component for the Acquisition of Thermotolerance in Plants. *Plant Cell*. **12**: 457-460.
- Guseynova I.M., Suleymanov S.Y., Aliyev J.A. (2006)** Protein composition and native state of pigments of thylakoid membrane of wheat genotypes differently tolerant to water stress. *Biochemistry (Moscow)*. **71**: 173-177.
- Hall M. H. (1993).** Alfalfa growth flowering release from drought stress. *Agro. J.* **85** : 991-994.
- Hanson A.D. et Hitz W.D., (1982).** Metabolic responses of mesophyles to plant water deficits. *Annual Review Plant Physiology*. **33** : 168-203.
- Hare P.D., Cress W.A. et Van Sstaden J. (1998).** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant; Cell and Environment*.**21**: 535-553.
- Hayes JD. et McLellan LI. (1999).** Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* **31**:273–300.
- Heckathorn SA., De Lucia EH. et Zielinski RE. (1997).** The contribution of drought-related decreases in foliar nitrogen concentration to decreases in photosynthetic capacity during and after drought in prairie grasses. *Physiologia Plantarum*. **101**: 173-182.
- Henson I.E. (1984).** Effect of atmospheric humidity on abscisic acid accumulation and water status in leaves of rice. *Ann Bot.* **54**: 569-582.
- Hikosaka K., Ishikawa K., Borjigidal A., Muller O. et Onoda Y. (2006).** Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *J. Exp. Bot.* **57**: 291–302.
- Hong S.W. et Vierling, E. (2001).** Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.* **27**: 25-35.
- Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z. et Verma D.P.S. (2000).** Removal of feedback inhibition of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* **122**, 1129–1136.
- Hubac C. et Viera da Silva J. (1980).** Indicateurs métaboliques de contrainte mesologiques. *Physiol. Vdg.* **18** : 45-53.
- Huck HG., Ichihar K., Peterson CM et Ushijama T., (1983).** Soybean adaptation to water stress at selected stages of growth. *Plant Physiol.* **73**: 42 427.
- Huffaker R.C. (1990).** Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol.* **116**: 199–231.
- Hundertmark M. et Hinch D.K. (2008).** LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics.* **9**: 118.

- Huseynova IM., Suleymanov SY. et Rustamova SM. (2010).** Response of Photosynthetic Apparatus and Antioxidant Defense Systems in *Triticum aestivum* L. Genotypes Subjected to Drought Stress. *Proceedings of ANAS (Biological Sciences)*. **65**: 49-5.
- Iba, K. (2002).** Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 225–245.
- Ingram, J. C. L. et Park, S.-G. (1997).** Cross-language vowel perception and production by Japanese and Korean learners of English. *J. Phonetics*. **25**: 343-370.
- Irigoyen JJ., Emerich DW. et Sanchez- Diaz M. (1992).** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol Plant.* **84**: 55-60.
- Jiang Y. et Huang B. (2001).** Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. *Journal of Experimental Botany*. **355**: 341-349.
- Kaiser WK., Speer M. et Menzel E. (1995).** Response of leaf cells to rapidly or slowly developing water deficits. In AJ Roy J., Di Castri F., ed, Time scales of biological responses to water constraints. *SPB Academic Publishing, Amsterdam*, pp 7-16.
- Kameli A. et Lösel D.M. (1995).** Contribution of carbohydrates and other solutes to osmotic adjustment in wheat leaves under water stress. *J. Plant Physiol.* **145** : 363-366.
- Katerdji N. et Cruizial P. (1985).** Etats et transferts hydriques chez les végétaux, quelques faits et problèmes in “ les besoins en eau des cultures ” *Ed INRA., Paris*.
- Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G.-H., Hu C.A.A. et Verma D.P.S. (1995).** Overexpression of A1-pyrroline-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* **108**: 1387-1394.
- Kiani P.S., Talia P., Maury P., Grieu P., Heinz R., Perrault A., Nishinakamasu V., Hopp E., Gentzbittel L., Paniego N. et Sarrafi A . (2007).** Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science.* **172**:773-787.
- Kjellbom, Larsson, Johansson, Karlsson, Johanson. (1999).** Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends in Plant Science.* **4**: 308–314.
- Kleines M., Ralph-Cyrus E., Maria-Jesus R., Anne-Sophie B., Francesco S., Dorothea B., Max P. (1999).** Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst.). *Planta.* **209**:13–24.
- Koizumi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Tsuji H. et Shinozaki K. (1993).** Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene.* **129** : 175–182.

- Kramer P.J. (1980).** Drought, stress and the origin of adaptation in adaptation of plants to water and high temperature stress(NC Tuner and PJ Kramer, ed), Wiley interscience. *New York*, pp.-21.
- Kramer P.J. (1983).** Water relations of plants. *Acad Press, Orlando, FL*, 489 pages.
- Kramer P.J. et Boyer J.S. (1995).** Water relations of plants and soils (Book). *Academic Press, Inc.*
- Laemmli U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lamb C. et Dixon R. (1997).** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* . **48**: 251-275.
- Larcher W. (1995).** physiological Plant Ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups, eds. *Springer , Verlag, Berlin Heidel Berg, Germany.*
- Lavergne, J. et Briantais, J.M., (1996).** Photosystem-II heterogeneity. In: Ort DR and Yocum CF (eds). Oxygenic photosynthesis: The light reactions, *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*. 265-287.
- Lawlor D.W. et Cornic G. (2002).** Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ*. **25** : 275–294.
- Lebon E. Pellegrino A., Tardieu F., et Lecoeur J., (2004).** Shoot development in grapevine is affected by the modular branching pattern of the stem and intra and inter-shoot trophic competition. *Annals of Botany* .**93**:263-274.
- Lecoeur J., Wery J., Turc O. et Tardieu F. (1995).** Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *Journal of Experimental Botany* .**46**:1093-1101.
- Lee U., Rioflorido I., Hong S.W., Larkindale J., Waters E.R., Vierling E. (2006).** The Arabidopsis ClpB/ Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J*. **49**, 115–127.
- Lee, J.H., Hubel, A. et Schoffl F. (1995).** Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J*. **8**:603–612.
- Leung J., Merlot S., Giraudat J. (1997).** The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*. **9**: 759-771.
- Levitt J. (1972).** reponses of plants to environmental stress *Acad. Press New York*.
- Levitt J. (1980).** Responses of Plants to Environmental Stresses.. *Academic Press, New York*.**2**.

- Lima A.L.S., DaMatta F.M., Pinheiro H.A., Totola M.R., Loureiro M.E., (2002).** Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.* **47**: 239–247.
- Llorens L., Peñuelas J., Estiarte M. (2003).** Ecophysiological responses of two Mediterranean shrubs, *Erica multiflora* and *Globularia alypum*, to experimentally drier and warmer conditions. *Physiologia Plantarum.* **119**: 231-243.
- Loggini, B., Scartazza A., Brugnoli E. et Navari-Izzo F. (1999).** Antioxidative defense system, pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Pl. Physiol.* **119**: 1091–9.
- Lowlor D.W. (2002).** Limitation to photosynthesis to water stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany.* **89**: 871-885.
- Luna CM., Pastori GM., Driscoll S., Groten K., Bernard S., Foyer CH. (2004).** Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *J. Exp. Bot.* **56**: 417.
- Magné C. et Larher F. (1992).** High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free praline. *Analytical Biochemistry.* **200**: 115-118.
- Matin MA., Brown JH. et Ferguson H. (1989).** Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. *Agron J.* **81**: 100–105.
- Mc Ready R M., Guggo J., Silverir V. et Owensh S. (1950).** Determination of starch and analise in vegetables. *Swedish Weed Conference.* 99-106.
- Meyer S. et Genty B. (1999).** Heterogeneous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubiginosa* L. during water stress and abscisic acid treatment: induction of a metabolic component by limitation of CO₂ diffusion. *Planta.* **210**: 126-131.
- Meyer W.S. and Green G.C. (1980).** Water use by wheat and plant indicators of average soil water. *Agron. J.* 72:253.
- Milioni D. et Hatzopoulos P. (1997).** Genomic organization of Hsp90 gene family in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* **35**:955–61.
- Mittler R. (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science.* **7**: 405–410.
- Mittler R. (2002).** Oxidative stress, antioxydants and stress tolerance. *Trends in Plant Science.* **7(9)**. 405-410.
- Mittler R. , Herr EH., Orvar BL. ,van Camp W., Willekens H., Inze D., Ellis BE. (1999).** Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 14165–14170.

- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004).** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**: 490–498.
- Mohopatra S.S., Poole R.J. et Dhindsa R.S. (1988).** Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant Physiol.* **87**: 468-473.
- 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.
- Monk LS, Fagerstedt KV, Crawford RMM (1989).** Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol Plant.* **76**: 456-459.
- Morgan J.M. (1984).** Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 299–319.
- Morris C.J., Thompson J.F. et Jonson C.M. (1969).** Metabolism of glutamic and N-acetylglutamic acid in leaf discs and cell free extracts of higher plants. *Plant Physiol.* **44**: 1023-1026.
- Mouellef A. (2010).** Caractères physiologiques et biochimiques de tolérance du blé dur (*Triticum durum Desf.*) au stress hydrique. *Mémoire de magistère*. Université Mentouri, Constantine. P 118.
- Munné-Bosch S. et Alegre L. (2000).** The significance of beta-carotene, alpha-tocopherol and the xanthophyll cycle in droughted *Melissa officinalis* plants. *Aust J Plant Physiol.* **27**: 139-146.
- Munne-Bosch S. et Alegre L. (2002).** The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci.* **21**: 31–57.
- Munné-Bosch S. et Peñuelas J. (2004).** Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. *Plant Science.* **166**: 1105-1110.
- Nacif de Abreu I. et Mazzafera P. (2005).** Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiol. Biochem.* **43** : 241–248.
- Nakamoto H. et Vigh L. (2007).** The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol. Life Sci.* **64**:294-306.
- Nakano Y. et Asada K. (1981).** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **22**:867- 880.
- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. et Shinozaki K. (1999a).** Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **461**: 205-210.

- Nanjo T., Masatomo K., Yoshiba Y., Sanada Y., Wada K., Tsukaya H., Kakubari, Y. Yamaguchi-Shinozaki K. et Shinozaki K. (1999b).** Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**: 185-193.
- Nishizawa A., Yukinori Y. et Shigeoka S. (2008).** Galactinol and raffinose as a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology.* **147**: 1251–1263.
- Nivogi KK. (1999).** Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50**:333–359.
- Noctor G. Veljovic-Jovanovic S. Driscoll S. Novitskaya L. Foyer CH. (2002).** Drought and oxidative load in leaves of C₃ plants: a predominant role for photorespiration, *Annals of Botany* **89**: 841–850.
- Parent C., Capelli N., Dat J. (2008).** Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C.R. Biologies.* **331**: 255-261.
- Passioura J.B. (1982).** Water in the soil-plant-atmosphere continuum. In: « The physiological plants ecology. II-Water relations and carbon assimilation ». Ed. Olange, Springer Verlag, BERLIN, p. 35.
- Pelah, D., Shoseyov O., Altman A. et Bartels D. (1997).** Water-stress responses in aspen (*Populus tremula*): Different accumulations of dehydrin, sucrose synthase, GAPDH homologues, and soluble sugars. *J. Plant Physiol.* **151**:96–100.
- Pelleschi S., Guy S., Kim J Y., Pointe C., Mahe A., Barthens L., Leonardi A. et Prioul J L. (1999).** IVR2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Genespecific repression under water stress; *Plant Mol. Biol.* **39**: 373–380.
- Penna S. (2003).** Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends in Plant Science.* **8**: 355-357.
- Perl A, Perl-Treves R, Galili G, Aviv D., Shalgi E., Malkin S., Galun E. (1993).** Enhanced oxidative stress defense in transgenic tobacco expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutase. *Theor Appl Genet.* **85**: 568–576.
- Polle A. (1997).** Defense against photooxidative damage in plants. In: Scandalios J, editor. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. **34**: 785-813.
- Polle A. (2001).** Dissecting the superoxide dismutase- ascorbate-glutathione-pathway in the chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* **126**: 445-462.
- Popham P L. et Novacky A.(1991).** Use of Dimethyl Sulfoxide to Detect Hydroxyl Radical during Bacteria-induced Hypersensitive Reaction. *Plant Physiol.* **96**: 1157-1160.

- Premachandra G.S. and Joly R. J. (1992).** Solutes contributing to osmotic pressure in young versus mature leaves of cacao seedlings. *Journal of Plant Physiology* 139: 355-360.
- Quartacci MF. et Navari-Izzo F. (1992).** Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedlings. *Journal of Plant Physiology*. **139**: 621-625.
- Queitsch C., Hong S.W., Vierling E. et Lindquist, S. (2000).** Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **12**: 479– 492.
- Quick WP., Chaves MM., Wendler R., et al. (1992).** The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell and Environment*. **15**: 25–35.
- Ramanjulu S. et Bartels D. (2002).** Drought and desiccation- induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell and Environment*. **25** : 141-151.
- Rathinasabapathi B. (2000).** Metabolic engineering for stress tolerance in slowing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany*. **25** : 709-716.
- Rayapati P.J. et Stewart C.R. (1991).** Solubilization of proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiol*. **95**: 787-791.
- Reddy A.R., Chaitanya K.V., Jutur P.P., Sumithra K. (2004).** Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environ. Exp. Bot.* **52** : 33–42.
- Rekika D., Nachit M.M., Araus J.L. et Monneveux P. (1998).** Effects of water deficit on photosynthetic rate and osmotic adjustment in tetraploid wheats. *Photosynthetica*. **35** : 129-138.
- Rey P., Cui n  S., Eymery F., Garin J., Court M., Jacquot JP., Rouhier N., Broin M. (2005).** Analysis of the proteins targeted by CDSF32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses. *Plant J*. **41**:31-42.
- Rey P., Pruvot G., Becuwe N., Eymery F., Rumeau D., Peltier G. (1998).** A novel thioredoxinlike protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant J*. **13**: 97-107.
- Rhodes Jean E., Ranjini Reddy. et Grossman Jean B. (2005).** “The Protective Influence of Mentoring on Adolescents’ Substance Use: Direct and Indirect Pathways.” *Applied Developmental Science*. **9**: 31-47
- Ritossa F. (1962).** A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. **18**: 571–573.
- Roy J. (1980).** Comportement photosynthétique et hydrique de la feuille chez *Dactylis glomerata* L. Adaptation ph notypique et g notypique   la sécheresse. Thèse e3 cycle, Univ. Montpellier, 118 p. annexe 153 p.

- Saab I.N. et Sharp R.E. (2004).** Non-hydraulic signals from maize roots in drying soil: inhibition of leaf elongation but not stomatal conductance. *Planta*. **179**:466-474.
- Sairam R.K. et Srivastava G.C. (2001).** Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): Variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *J. Agron. and Crop Sci.* **186**: 63–70.
- Sairam R.K., Rao K.V. et Srivastava G.C. (2002).** Differential response of wheat genotypes to term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Pl. Sci.* **163**: 1037–46.
- Sauter A. Davies W.J. et Hartung W. (2001).** The long-distance abscisic acid signal in the droughted the fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany*. **52**:1991-1997.
- Sawahel WA. et Hassan AH. (2002).** Generation of transgenic wheat plants producing high levels of osmoprotectant proline. *Biotechnol. Lett.* **24**: 721-725.
- Schaller B. (2004).** Physiology of cerebral venous blood flow: from experimental data in animals to normal function in humans. *Brain Res Rev.* **46**: 243-260.
- Schonfeld MA., Johnson BF., Craver BF., Morhinweg DW. (1988).** Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Sci.* **28**: 526–531.
- Schulze S. (1986).** Wild plant responsif to drought. *Aust. J. Plant. Phys.* **13** : 127-141.
- Schwacke R., Grallath S., Breitzkreuz K.E., Stransky E., Stransky H., Frommer W.B., Rentsch D. (1999).** LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine and γ -amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell*. **11**: 377-391.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., et al. (2002).** Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*. **31** : 279–292.
- Selye M. (1936).** A syndrome produced by diverse nocuous agent. *Nature*. **138**:32.
- Serraja R. et Sinclair T.R. (2002).** Osmolytes accumulation can it really help increase crop yield under drought conditions. *Plant Cell et Environment*. **20**: 333.
- Sestak, Z. et Vaclavik J. (1965).** In: Slavik, B., (ed.) Water Stress in Plants, *Czech. Acad. Science Prague*. 210–216.
- Sharma P. et Dubey RS. (2005).** Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. **17**: 35-52.
- Shen B. , Jensen R.G , Bohnert H.J. (1997),** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.* **113**:1177-1183.

- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., et Yoshimura K. (2002).** Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 1305–1319.
- Shigeoka S., Nakano Y., Kitaoka S. (1980).** Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* Z by L-ascorbic acid peroxidase. *Biochemical Journal*. **186**: 377–380.
- Skiver K. et Mundy J. (1990).** Gene expression in response to abscisic acid in osmotic stress. *Plant Cell*. **2**:503-512.
- Smirnoff N. (1993).** The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* **125**:27–58.
- Smirnoff, N. (1995).** Antioxidant system and plant responses, In: Smirnoff, N., (ed.) Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation, *Bios Scientific Publishers, Oxford*. 217–43.
- Soar C.J. et Loveys B.R. (2007).** The effect of changing patterns in soil-moisture availability on grapevine root distribution, and viticultural implications for converting full-cover irrigation into a point-source irrigation system. *Australian Journal of Grape et Wine Research*. **13**:2-13.
- Stewart C.R., Boggess S.F., Paleg L.G. et Aspinall D. (1977).** Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiol.* **59**: 930-932.
- Suzuki M., Koide Y., Hattori T., Nakamura K., Asahi T (1995)** Different sets of cis-elements contribute to the expression of a catalase gene from castor bean during seed formation and postembryonic development in transgenic tobacco. *Plant and Cell Physiology*. **36**:1067-1074.
- Tahri E.H., Belabed A. et Sadki K. (1998).** Effet d'un stress osmotique sur l'accumulation de proline, de chlorophylle et des ARNm codant pour la glutamine synthétase chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum*). *Bull. Inst. Sci., Rabat*. **21**: 81-87.
- Tissieres A., Mitchell H.K., Tracy U.M., (1974).** Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84**: 389–398.
- Todd G.W. (1972).** Water deficit and enzymatic activity, in water stress and plant growth. *New York Acad. Press*.
- Tournaire C., Croux S., Maurette Mt., Beck I., Hocquaux M., Braun Am. et Oliveros E. (1993).** Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen quenching. *J Photochem Photobiol B*. **19**: 205-215.
- Troll W. et Lindsley J. (1955).** A photometric method for the determination of proline; *J. Biochem.* **39** : 655-660.
- Troll W., and Lindsley J. (1955).** A photometric method for the determination of proline. *J. Biol. Chem.*, **215**: 655-660.

- Türkan I., Bor M., Özdemir F. et Koca H. (2005).** Differential response of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Pl. Sci.* **168**: 223–231.
- Upadhyaya H., Panda S.K. et Dutta B.K. (2008).** Variation of physiological and antioxidative responses in tea cultivars subjected to elevated water stress followed by rehydration recovery. *Acta Physiol. Plant.* **30** : 457–468.
- Valentovič P., Luxová M., Kolarovič L., Gašparíková O. (2006).** Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil Environ.* **52**:186–191.
- Van den Ende W. et Van Laere A. (1995).** Purification and properties of a neutral invertase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiol Plant.* **93** : 241-248.
- Vidal A., Arnaudo D. et Arnoux M. (1981).** La résistance à la sécheresse du soja. I. – Influence du déficit hydrique sur la croissance et la production. *Agronomie*, 1 (4): 295-302.
- Vidal A., Arnaudo D. et Arnoux M. (1981).** La résistance à la sécheresse du Soja. *Agronomie*. **1**. 295-313.
- Wang HJ., Jauh GY., Hsu YH. et Wang CS. (2003).** The nuclear localization signal of a pollen-specific, desiccation-associated protein of lily is necessary and sufficient for nuclear targeting. *Bot Bull Acad Sin.* **44**:123–128.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. et Altman A. (2004).** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*.
- Wang Z., Huang B. (2004).** Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. *Crop Science* **44** : 1729-1736
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., VanMontagu M., Inze D. et VanCamp W. (1997).** Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *Embo Journal*. **16**: 4806-4816.
- Willekens H., Langebartels C., Tire C., Vanmontagu M., Inze D. et Vancamp W. (1994).** Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**: 10450-10454.
- Wise R.R. (1995).** Chilling-Enhanced Photooxidation – the Production, Action and Study of Reactive Oxygen Species Produced During Chilling in the Light. *Photosynthese Research*. **45** : 79-97.
- Wisniewski M., Webb R., Balsamo R., Close T.J., Yu X.-M. et Griffith M. (1999).** Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiol Plant*. **105**: 600-608.

Wu Y. et Cosgrove D J. (2000). Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany*. **51**: 1543-1553.

Yamaguchi-Shinozaki K., Koizumi M., Urao S. et Shinozaki K. (1992). Molecular Cloning and Characterization of 9 cDNAs for Genes That Are Responsive to Desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence Analysis of One cDNA Clone That Encodes a Putative Transmembrane Channel Protein. *Plant Cell Physiol.* **33** : 217–224.

Yoshida Y., Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. et Shinozaki K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiology.* **38** : 1095-1102.

Young A. et Britton G. (1990). Carotenoids and stress. In R.G. Alscher & J.R. Cumming (Eds), Stress response in plants: Adaptation, acclimation mechanisms. *New York* : 87-112.

Zerrad W., Maataoui B.S., Hilali S., El Antri S. et Hmyene A. (2008). etude comparative des mecanismes biochimiques de resistance au stress Hydrique de deux varietes de ble dur. *Lebanese Science Journal.* **Vol. 9, No.2**: 27- 36.

Zhang H.Q., Croes A., et Linskens H. (1982). Protein synthesis in germinating pollen of *Petunia*: Role of proline. *Planta.* **154**: 199–203.

Zhang J. et Kirkham MB. (1994). Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology.* **35**: 785-791.

Zhu B, Su J, Chang M, Verma DPS, Fan YL, et Wu R. (1998). Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci.* **139**:41–48.

Zhu J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sci.* **6**: 66-71.

Annexes

Annexes

Les réactifs utilisés

I) Les sucres éthanolosolubles

0.2 g d'Anthrone
100 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 91 %

II) Protéines totales

10mg de bleu de Coomassie (G 250)
5 ml d'éthanol à 95 %
10 ml d'acide orthophosphorique à 85 % (H_3PO_4)
Compléter à 100ml avec l'eau distillée

III) Proline

1.25 mg de ninhydrine
30 ml d'acide acétique pur (CH_3COOH)
7.5 ml d'acide orthophosphorique à 85 % (H_3PO_4)

VI) solutions tampons et préparation des gels de SDS-PAGE

1) Laemmli Buffer Tampon de dénaturation des protéines (échantillon)

- 6.25 ml de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8.
-1.15 g de SDS.
-5 ml glycérol.
-5 g saccharose.
-0.25 g Bleu de Bromophénol.
-A juster à 25 ml avec l'eau distillée.

2) Solution mère d'acrylamide-Bis acrylamide à 30 %

-29.2 g d'acrylamide.
-0.8 g Bis acrylamide.
-100 ml d'eau distillée.

3) Solution d'APS (Ammonium Persulfate) à 10 %

-0.1 g d'APS.
-1 ml d'eau distillée

4) Tampon Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

-18.165 g de Tris.
-100 ml de l'eau distillée.
-Ajuster à pH 8.8 avec HCl fumant.

5) Tampon Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

-6.055 g de Tris.
-100 ml de l'eau distillée.
-Ajuster à pH 8.8 avec HCl fumant.

6) Tampon d'électrophorèse (migration)

- 6 g de Tris.
- 28.8 g de Glycine.
- 2 g de SDS.
- Ajuster à 2l avec l'eau distillée

7) Solution de coloration

- 0.85 g de bleu de Coomassie **R250**.
- 500 ml de méthanol.
- 100 ml d'acide acétique.
- Ajuster avec de l'eau distillée à 1000 ml.

8) Solution de décoloration

- 500 ml de méthanol.
- 100 ml d'acide acétique.
- Ajuster avec de l'eau distillée à 1000 ml.

9) Gel de séparation ou de migration

- 2.8 ml d'acrylamide-Bis acrylamide.
- 1.5 ml Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8.
- 1.57 ml de l'eau distillée.
- 20 µl de Temed.
- 80 µl d'APS à 10 %.

10) Gel de concentration à 5 %

- 1.5 ml d'acrylamide-Bis acrylamide.
- 0.625 ml Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.
- 1.535 ml de l'eau distillée.
- 10 µl de Temed.
- 30 µl d'APS à 10 %.

Abstract

This work propose to study the effect of drought stress on variability of physiological responses behavior of two varieties of *Lens culinaris* L Balkan 755 Amir and Champagne. Interest is given to quantitative and qualitative changes of proteins as well as the activity of an antioxidant enzyme, catalase. Stress disrupts the water status of seedlings of two varieties which induces an accumulation of proline that plays a role in osmotic adjustment. The water deficit also causes a decrease in photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids). Oxidative stress that accompanies this water stress generates reactive oxygen species responsible for lipid peroxidation, especially membrane phospholipids. This peroxidation estimated by reactive substances whose malonyldialdehyde barbituric acid (MDA) or in terms of membrane integrity is more important in var. Champagne. To counter this oxidative stress, catalase activity and ascorbate peroxidase are increased.

At the protein level, we record a decrease in total protein content, result of reduced photosynthesis and mineral uptake. At the qualitative level, we have demonstrated by SDS-PAGE the appearance of two new stress proteins of approximately 30 kDa and 60 kDa. The first would be :

- A CDSP 32 (chloroplastic Drought-induced stress protein), thioredoxin-like protein localized in the chloroplast whose accumulation is induced by severe stress. It plays a role by maintaining the thiol redox-disulfite during stress.

-Or a CDSP 34, a protein located in thylacoids, is induced by a progressive and moderate water stress. The alleged role of this chloroplastic protein is in relation to the tolerance of the photosynthetic apparatus to dehydration.

The second stress protein, observed only in var. Balkan, would be a dehydrin (CPA 60) known to accumulate in greater amounts in resistant genotypes. The dehydrins are proteins induced by environmental stresses that cause dehydration of the cells.

Key words: *Lens culinaris* L, drought, physiology, morphology, antioxidant activity, SDS-PAGE.

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة استجابة نوعين من العدس النوع Champagne و النوع Balkan للتوتر المائي و هذا بدراسة التغيرات البيوكيميائية ، الفيزيولوجية و المورفولوجية للتوتر المائي يسبب اضطرابا في الحالة المائية للشتلات عند النوعين مما يؤدي إلى تراكم حمض البرولين الذي قد يلعب دورا هاما في ضبط الضغط الأسموزي الذي يمكن أن يكون أيضا بتراكم السكريات القابلة للذوبان الذي لم يسجل إلا عند النوع شامباني يؤدي التوتر المائي إلى نقص في بعض الإعدادات الخاصة بالتركيب الضوئي مثل اليخضور و الجزرين التوتري الأوكسيدي الناتج التوتر المائي يؤدي إلى أكسدة الدهون على مستوى الأغشية التي تقاوم بدراسة كمية المتفاعلة مع حمض ثيوباربيتوريك منها المالنويل الدهيد أو بدراسة التسرب النسبي للأيونات الذي لاحظنا أنه أعلى عند النوع شامباني للحد من آثار التوتر الأوكسيدي لاحظنا ارتفاع نشاط الأنزيم كاتالاز بالنسبة للبروتينات لاحظنا نقص في كمية البروتينات الكلية الذي نتج عن نقص الإستيعاب اليخضوري و المعدني لمعرفة تركيبة البروتينات قمنا بالهجرة الكهربائية التي بينت ظهور بروتينات ذات وزن من 30kDa و 60 kDa

كلمات المفتاح : التوتر المائي العدس الفيزيولوجية و المورفولوجية الهجرة الكهربائية