

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI
BOUMEDIENNE

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES

Thèse présentée pour l'obtention du grade de MAGISTER

En : Sciences de la Nature

Spécialité : Ecobiologie et Amélioration Végétale.

par : Dinar MOHAMED-OUALI

THEME

**Effet d'une contrainte hydrique sur le comportement physiologique
*Nicotiana sylvestris L***

Soutenue publiquement le 24 / 09 / 2003 devant un jury composé de :

| | | |
|--------------------------------------|--|------------------------------|
| M^{me} N. BOUGUEDOURA | Professeur – FSB / USTHB | Présidente |
| M^{me} F. AID | Maître de Conférence – FSB / USTHB | Directeur de thèse |
| M^r R. DJEBBAR | Chargé de Cours- FSB / USTHB | Co-directeur de thèse |
| M^r A. DJEKOUN | Professeur- Université de Constantine | Examineur |
| M^{me} O. ABROUS | Chargée de Cours- FSB / USTHB | Examinatrice |
| M^{me} L. HANNACHI | Maître Assistante – Université de T-Ouzou | Invitée |

Remerciements

Au terme de ce travail, réalisé au laboratoire de physiologie végétale de la faculté des sciences biologiques de l'USTHB, je tiens à remercier vivement :

M^r R Djebbar, chargé de cours à l'USTHB, de m'avoir proposé le sujet, d'avoir contribué activement à la réalisation de ce travail par son extrême disponibilité et qui a mis à ma disposition tous les moyens afin de mener à terme ce travail, qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance et estime.

M^{me} F Aid, maître de conférence à l'USTHB, pour son dévouement au service de la recherche, pour m'avoir suivie et orientée avec grande patience et pour le temps qu'elle m'a consacré afin de mener à bon terme ce travail. Qu'elle trouve ici, l'expression de ma profonde gratitude et respect.

M^{me} Bouguedoura, professeur à l'USTHB, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et pour qui j'ai beaucoup de respect et de considération.

M^r A Djekkoun, professeur à l'université de Constantine, qui malgré ses responsabilités, a accepté de juger ce travail.

M^{me} O Abrous, chargée de cours à l'USTHB, d'avoir accepté de juger ce travail et pour qui j'ai beaucoup d'estime et de respect.

M^{me} L Hannachi, maître assistante titulaire à l'université de Tizi-Ouzou d'avoir accepté notre invitation et de faire partie du jury.

Toute l'équipe du laboratoire de physiologie végétale, pour qui j'ai beaucoup d'estime : F Abdelkrim, O Abous, A Belkebir, Z Zegaoui, B Lynda, K Boulahia, M Taibi et Ali.

Nedjma, dont l'extrême gentillesse à mon égard n'a jamais failli, qui a su se pencher discrètement et sincèrement sur mes problèmes. Je ne saurai que lui dire merci.

Rabah Beggah, qui a su vraiment donner l'image du frère, je n'oublierai jamais son assistance malgré ses tâches.

Nassima et Souhila, qui demeurent le plus beau cadeau de mon parcours.

Zahra et Lamia (mes filles adoptées), qui ont su recréer en moi une ambiance si longtemps oubliée.

Mes collègues du laboratoire de botanique médicale de l'université d'Alger et particulièrement Mika, Leila et Rachida pour leurs encouragements incessants et leur considération et patience à mon égard.

A tous mes collègues en post graduation pour leur sincère amitié.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Les plantes de *Nicotiana sylvestris* ont subi un arrêt d'arrosage de 38 jours. Les plantes de tabac sont analysées régulièrement. Jusqu'au 6^{ème} jour de l'arrêt d'arrosage, aucune différence significative n'est à signaler entre les plantes témoins et stressées sur les différents paramètres mesurés : la teneur relative en eau des feuilles la teneur en eau du substratum, l'intégrité membranaire et teneurs en proline, sucres solubles, protéines et les pigments photosynthétiques. La croissance est également maintenue.

Entre le 6^{ème} et 25^{ème} jour de l'arrêt d'arrosage, la teneur en eau des feuilles se maintient. La proline est la première à s'accumuler à partir du 6^{ème} jour, suivie par les sucres solubles à partir du 16^{ème} jours. Ces deux osmolytes maintiennent une rétention de l'eau permettant le déroulement des activités vitales de la plante. Ainsi, la teneur en protéines et en pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) demeure stable, assurant ainsi un bon maintien des membranes cellulaires.

A partir du 25^{ème} jour de déshydratation, l'intensité du stress devient important et engendre la succession d'une série d'évènements. La teneur en eau du sol diminuant, la teneur en eau des feuilles baisse également. Parallèlement, la teneur en protéines solubles et des chlorophylles et caroténoïdes diminue alors que la proline et les sucres solubles s'accumulent d'avantage. En effet, la teneur en proline enregistrée en fin de l'expérimentation est de 6 fois plus importante et celle des sucres solubles est de deux fois plus importantes. Ces deux osmolytes, outre leur rôle principal dans l'ajustement osmotique, assurent la protection des systèmes membranaires. En effet, l'intégrité membranaire n'est touchée qu'à partir du 35^{ème} jour et elle est encore plus altérée au 38^{ème} jour de déshydratation.

Les plantes de *Nicotiana sylvestris* se sont montrées résistantes au déficit hydrique à travers une forte rétention d'eau via l'accumulation d'osmoprotectants notamment la proline et les sucres solubles assurant ainsi un bon ajustement osmotique.

Mots clés : *Nicotiana sylvestris*, proline, sucres solubles, intégrité membranaire, protéines, chlorophylles, caroténoïdes, TRE, stress hydrique.

Nicotiana sylvestris plants underwent a stop of watering during 38 days. Tobacco plants are analyzed every two days at the beginning, then every three days and, finally, every six days. Until the 6th day of the stop of watering, no significant difference has been noticed between the control and stressed plants for the various measured parameters : relative water content of the leaves, membrane integrity and proline, soluble sugars, proteins and photosynthetic pigments contents. The growth is also maintained.

Between the 6th and 25th day of the stop of watering, the water content of the leaves is maintained. Proline is the first to be accumulated starting from the 6th day, following by soluble sugars starting from the 16th days. These two osmolytes allow a retention of water ensuring the course of the vital activities of the plant. Proteins and photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids) content also remain stable, meaning a good maintenance of the cellular membranes. From the 25th of dehydration, the intensity of the stress becomes important and generates a succession of series of events. The water content of the ground decreases and, so, the water content of the leaves drops. At the same time, soluble proteins and chlorophylls and carotenoids contents decrease whereas proline and soluble sugars accumulate more. Indeed, proline content recorded in end of the experimentation is six times more important and soluble sugars content is twice more important than the control. In addition to their principal role in the osmotic adjustment, these two osmolytes ensure the protection of the membrane systems. Indeed, the membrane integrity is only affected from the 35th day, and it is drastically deteriorated only from the 38th day of dehydration.

Nicotiana sylvestris plants were resistant to the water deficit through a strong retention of water via the accumulation of osmoprotectants and mainly proline and soluble sugars, thus ensuring a good osmotic adjustment.

Key words : carotenoids, chlorophylls, membrane integrity, *Nicotiana sylvestris*, proline, proteins, RWC, soluble sugars, water stress.

| | |
|---|-----------|
| 1 – Introduction | 1 |
| 2 - Rappels Bibliographiques | 3 |
| 2.1 - <i>Nicotiana sylvestris</i> | 3 |
| 2.2 - Définition du stress | 5 |
| 2.3 - Le statut de l'eau dans la plante | 6 |
| ☐ Potentiel hydrique | 6 |
| ☐ Teneur relative en eau | 6 |
| 2.4 - Action du stress hydrique sur la fermeture des stomates | 8 |
| 2.5 - Action du stress hydrique sur la croissance foliaire | 9 |
| 2.6 - Les pigments photosynthétiques | 10 |
| 2.6.1 – Les chlorophylles | 10 |
| 2.6.2 – Caroténoïdes | 12 |
| 2.7 - Action du stress hydrique sur la photosynthèse | 13 |
| 2.8 - Action du stress hydrique sur le métabolisme protéique | 14 |
| ☐ Les protéines de stress | 15 |
| • Les Heat Shock Proteins (HSPs) | 15 |
| • Les Late Embryogenesis Abundant (LEAs) | 15 |
| 2.9 - Ajustement osmotique | 16 |
| • La proline libre | 16 |
| • Les sucres solubles | 18 |
| 2.10 - Intégrité membranaire | 20 |
| 2.11 – Signalisation | 23 |
| 3 - Matériel et Méthodes | 26 |
| 3.1 - Matériel végétal | 26 |
| 3.1.1 - Mise en culture des graines et traitement | 26 |
| 3.1.2 - Application du stress | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 - Méthodes utilisées | 27 |
| 3.2.1 - Mesure de la teneur en eau du sol | 27 |
| 3.2.2 - Statut hydrique de la feuille | 27 |
| •Teneur relative en eau | 27 |
| •Teneur en eau des feuilles | 28 |
| • Mesure de l'efflux d'ions | 28 |
| 3.2.3 - Analyses biochimiques | 29 |
| •Extraction et dosage des pigments foliaires | 29 |
| • Extraction et dosage des sucres solubles | 29 |
| •Extraction et dosage de la proline | 31 |
| •Extraction et dosage des protéines hydrosolubles | 32 |
| 4 - Résultats et Discussion | 33 |
| 4.1 - Statut hydrique | 33 |
| 4.1.1 - Evolution de la TRE au cours du dessèchement du substratum | 33 |
| 4.1.2 – Discussion..... | 34 |
| 4.2 – Accumulation des osmolytes | 35 |
| 4.2.1 – Effet de la contrainte hydrique sur le taux de la proline libre | 35 |
| 4.2.2 – Effet de la contrainte hydrique sur le taux des sucres solubles | 35 |
| 4.2.3 – Discussion | 36 |
| 4.3 - Répercussion de la contrainte hydrique sur la croissance du végétal | 38 |
| 4.3.1 – Evolution du poids de la partie aérienne | 39 |
| 4.3.2 – Evolution du poids sur le système racinaire | 39 |
| 4.3.3 – Le rapport pondéral Partie aérienne / racine | 40 |
| 4.3.4 – Discussion | 41 |
| 4.4 – Effet de la contrainte hydrique sur l'intégrité membranaire | 42 |
| 4.4.1 – Discussion | 43 |
| 4.5 – Effet de la contrainte hydrique sur le taux des protéines hydrosolubles | 44 |
| 4.5.1 – Discussion | 45 |
| 4.6 - Les pigments photosynthétiques | 46 |
| 4.6.1 – Effet de la contrainte hydrique sur le taux des chlorophylles | 46 |
| 4.6.2 – Effet de contrainte hydrique sur le taux des caroténoïdes | 48 |
| 4.6.3 – Discussion | 48 |
| 5 – Conclusions générales | 52 |
| 6 – Références bibliographiques | 57 |

Abréviations

| | |
|------------------------------------|--|
| ABA : | Acide abscissique |
| ABRE : | Elément de réponse à l'acide abscissique |
| al : | Collaborateurs |
| ADN : | Acide désoxyribose nucléique |
| ARN : | Acide ribonucleique |
| ARNm : | Acide ribonucléique messenger |
| Atm : | Atmosphère |
| ATP : | Adénosine triphosphate |
| AtPDH: | Antisens proline déshydrogénase |
| °C : | Degré celcius |
| CDPK : | Calcium dépendante protéine kinase. |
| cm : | Centimètre |
| cm² : | Centimètre carré |
| cv : | Cultivar |
| DO : | Densité optique |
| DRE : | Elément de réponse à la déshydratation |
| FAD⁺ : | Flavine adénine dinucléotide (forme oxydée) |
| FADH₂ : | Flavine adénine dinucléotide(Forme réduite) |
| Fig : | Figure |
| g : | Gramme |
| GSA : | Acide glutamique γ -semi aldehyde |
| J /mol : | Joule par mole |
| KDa : | Kilodalton |
| LEA : | Late Embryogenesis Abundant |
| LHC : | Antenne collectrice de lumière |
| M : | Molaire |
| MAPK : | Protéine Kinase de type sérine-thréonine |
| MIP : | Protéines majeures intrinsèques. |
| mg : | Miligramme |
| mg.g⁻¹ : | Miligramme par gramme. |
| ml : | Mililitre |
| Mm : | Milimole |
| mm : | Milimètre |
| Mpa : | Mégapascal |
| MVF : | Matière végétale fraîche |
| MVS : | Matière végétale sèche |
| NAD⁺ : | Nicotinamide adénine dinucléotide(Forme oxydée) |
| NADH : | Nicotinamide adénine dinucléotide(Formeréduite) |
| NADP⁺ : | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate(Forme oxydée) |
| NADPH : | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate(Forme réduite) |
| nm : | Nanomètre |
| ¹O₂ : | Oxygène singulet |
| O₂⁻ : | Anion superoxyde |
| OH: | Radical hydroxyl |
| P34^{cdc2} : | Protéine Kinase du cycle de division cellulaire |
| P5C : | Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate |

| | |
|---|--|
| P5CDH : | Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase |
| P5CR : | Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate réductase |
| P5CS : | Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase |
| PM28A : | Aquaporine de la membrane plasmique des feuilles d'épinard |
| PROT1 : | Transporteur de proline |
| PSII : | Photosystème II |
| PF : | Poids frais |
| PS : | Poids sec |
| PT : | Poids à la turgescence |
| RubisCO : | Ribulose biphosphate carboxylase-oxygénase |
| SPPase : | Saccharose6-phosphate phosphatase |
| SPS : | Saccharose phosphate synthétase |
| SS : | Saccharose synthétase |
| TRE : | Teneur relative en eau |
| Trs : | Tours |
| UDP : | Uridine diphosphate |
| μg : | Microgramme |
| $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$: | Microgramme par gramme |
| μs : | Microsièmes |
| UV : | Ultraviolet |
| var : | Variété |
| % : | Pourcentage |
| λ : | Longueur d'onde |

1- Introduction

Les processus impliqués dans l'élaboration du rendement d'une culture sont influencés par deux types de facteurs : les facteurs génétiques intrinsèques à la plante et les facteurs environnementaux.

Parmi ces derniers, le déficit hydrique constitue l'un des facteurs limitant la croissance des plantes et la production des récoltes (Bray, 1997).

La résistance aux conditions hydriques défavorables est une propriété essentielle des végétaux supérieurs, indispensable à la vie en milieu aérien. Différentes stratégies de tolérance ont été identifiées que l'on peut regrouper en trois grands types d'adaptation (Bray, 1997) :

- ✓ **L'échappement** ou l'évasion (*escape*) qui consiste à réaliser l'ensemble du cycle de développement pendant la période favorable, c'est à dire en dehors des périodes de sécheresse (cas des espèces éphémères du désert). Ces espèces évitent le stress en germant, croissant et fleurissant très rapidement juste après les pluies saisonnières.
- ✓ **La tolérance à la déshydratation** consiste en un ensemble d'aptitudes à résister aux effets d'un faible potentiel hydrique (résistance mécanique, résistance aux dégradations membranaires...). Ce type de résistance s'exprime par un maintien de la turgescence, malgré un potentiel hydrique négatif, rendu possible grâce au phénomène d'ajustement osmotique (synthèse accrue d'osmolytes variés) (Ramanjulu et Bartels, 2002), par une capacité de la membrane à conserver son intégrité (Monneveux et *al.*, 1995), par la synthèse de plusieurs protéines de stress couplée avec un système antioxydant efficace (Ramanjulu et Bartels, 2002) ainsi que par un maintien de la translocation (Badji et Feyen, 1995).
- ✓ **L'évitement** ou l'esquive (*avoidance*) permet à la plante de maintenir un potentiel hydrique relativement élevé dans la plante. Cette stratégie est réalisée grâce à certains caractères adaptatifs morphologiques et notamment une réduction de la surface transpirante, une diminution du nombre et de la localisation des stomates, la présence d'une cuticule épaisse, etc.... (Ramanjulu et Bartels, 2002).

Le maintien d'un faible potentiel hydrique foliaire est également lié à une optimisation de l'absorption de l'eau par les racines. Ces dernières adoptent un ensemble de caractères morphologiques particuliers (longueur, volume, ramifications) de manière à utiliser plus efficacement l'eau. Ces caractères adaptatifs permettent d'équilibrer le bilan hydrique en réduisant les pertes en eau par évapo- transpiration et en augmentant l'absorption d'eau.

Au niveau des plantes, la balance hydrique est déterminée par la perte de l'eau par évaporation (transpiration) et son absorption à partir du sol. Dès que la perte de l'eau par transpiration dépasse le taux d'absorption, il y a déficit hydrique. Ce dernier affecte l'ensemble des processus morphologiques, physiologiques et biochimiques.

En effet, le moindre changement dans le bilan hydrique des plantes peut entraîner la fanaison, le flétrissement, la réduction de la croissance et du rendement, et même la mort de la plante si le stress est sévère (Ramanjulu et Bartels, 2002).

Notre étude est menée dans le but d'étudier et de comprendre la succession d'évènements survenant au cours d'un déficit hydrique et leurs interrelations. Pour ce, nous avons mesuré certains paramètres tels que : la teneur relative en eau, la teneur en eau du substratum, l'intégrité membranaire, les teneurs en proline, en sucres solubles, en protéines hydrosolubles et en pigments photosynthétiques ainsi que la croissance.

Elle a porté sur *Nicotiana sylvestris* L., lequel fait l'objet d'intenses études dans les différents laboratoires à travers le monde et particulièrement à l'Institut de Biotechnologies des Plantes d'ORSAY (Paris XII). Ainsi, ce travail se veut une contribution aux études menées par ailleurs sur un mutant de *Nicotiana sylvestris* (CMS2) (la mutation est au niveau mitochondriale), considéré comme résistant à la déshydratation.

En effet, le mutant de *Nicotiana sylvestris* est dépourvue d'une sous unité du complexe I fonctionnel de la chaîne respiratoire et qui maintient un taux de respiration normal grâce à l'activité des NADH déshydrogénase alternes.

2- Rappels bibliographiques

2.1. *Nicotiana sylvestris* L

Nicotiana sylvestris L est une plante herbacée, gracieuse, vivace, originaire d'Amérique du sud. Elle est cultivée comme annuelle dans les zones tempérées et pérenne dans les zones sans hivers glacés.

C'est une espèce qui prédomine à la fin de l'été. Elle appartient au sous embranchement des Angiospermes, classe des Dicotylédones, ordre des Solanales, famille des Solanacées. On l'appelle communément "le tabac sylvestre", "le tabac des bois", "le tabac géant", "le tabac fleuri" ou "le seul solitaire".



Photo 1 : Aspect général de *Nicotiana sylvestris*. (In [http : // plantsdatabase.com](http://plantsdatabase.com))

A l'instar des espèces voisines, le tabac sylvestre peut dépasser 1,5m de hauteur (jusqu'à 3m de hauteur) et peut atteindre 0,4 à 1m de diamètre.

Le système racinaire est assez vigoureux et pivotant (Photo. 2 A). Les tiges sont assez épaisses. Les premières feuilles se forment en rosettes au printemps. Elles sont grandes, de type caduques, ovales, pointues à l'extrémité et décurrentes à la base de la tige, de couleur verte nette, visqueuses, gluantes (présence de glandes à résine), atteignant une longueur d'une trentaine de cm (Photo1).

A



B



Photo 2 : Aspect du système racinaire (A) et des fleurs (B) de *Nicotiana sylvestris*.

Le tabac sylvestre attend la fin de l'été (Juillet-Août) pour épanouir ses élégantes fleurs blanches à corolle au long tube (fleurs tubuleuses) de 3 cm de longueur et 1,5 cm de largeur, très parfumées, à odeur luxuriante qui ressemble au jasmin, ce qui attirerait les insectes (oiseaux mouches). Les fleurs sont réunies en grappes et émergent longuement, avec ampleur, du feuillage (apparaissent en masse sur les ramifications de la plante) (Photo. 2 B).

Nicotiana sylvestris est pollinisée par les papillons. Les gousses commencent à se former à partir de janvier, les feuilles conservent leur apparence verte, entièrement visqueuses et piègent les insectes volants. *Nicotiana sylvestris* est taillé en automne et il produit rapidement des feuilles en rosettes en hiver. Comme les espèces de ce genre, les feuilles sont capables de contenir des poisons narcotiques. En effet, chez les jardiniers à la peau fragile, le contact avec les feuilles glanduleuses peut causer de légères irritations

Nicotiana sylvestris se multiplie par graines, au printemps, au chaud (20°C). Les graines minuscules ont un besoin de lumière pour germer durant 5 à 15 jours.

2.2 - Définition du stress

Ce mot d'origine anglaise, désigne à la fois "l'agent exerçant une contrainte" et "la situation de contrainte". Dans plusieurs définitions, le stress est considéré comme une déviation significative des conditions optimales de la vie entraînant des changements et des réponses au niveau fonctionnel de l'organisme (Larcher, 1995).

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

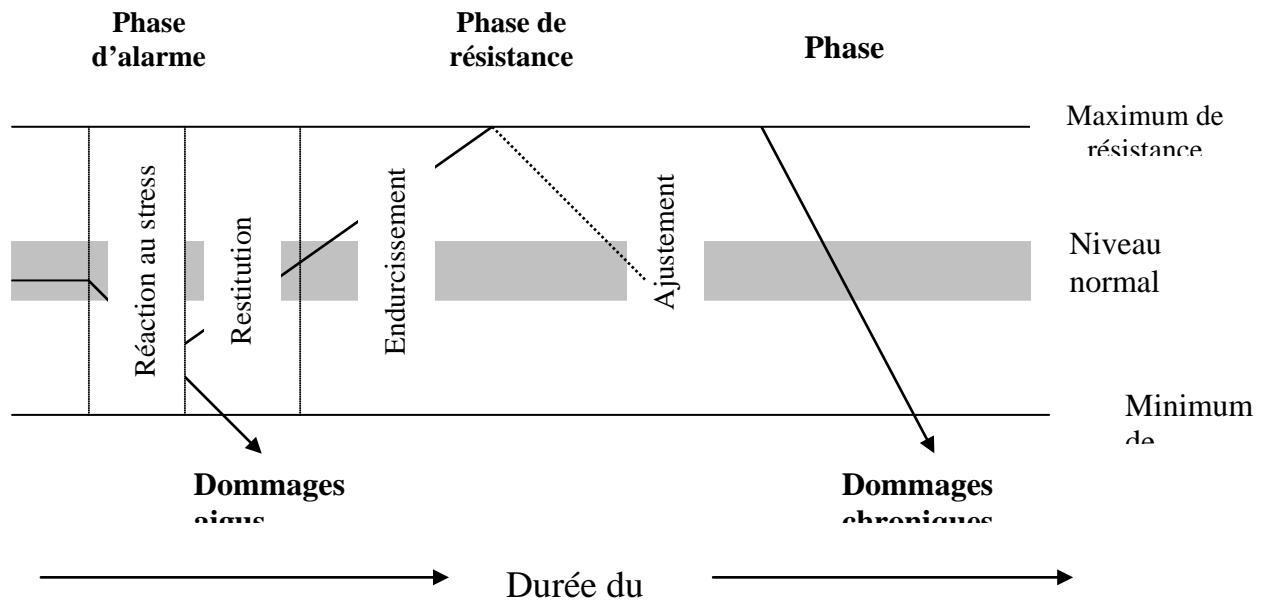


Figure 1 : Les phases successives d'un stress (d'après Selye, 1936, 1973 et Stockers, 1947 ; In Larcher, 1995).

Lorsque une contrainte (ou un facteur stressant) survient au niveau cellulaire, commence immédiatement **la phase d'alarme**. Elle débute par la déstabilisation d'un certain nombre de structures, en particulier les membranes, et d'un certain nombre de fonctions (processus biochimiques et métabolisme énergétique) requises 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 apparaissent très rapidement, des processus de réparation et de restauration de l'état initial par la synthèse de molécule de protection, c'est **la réaction de restitution ou de récupération**. Il y a, alors, retour à l'état initial à condition que le facteur de stress disparaît.

Si le facteur de stress continue, voire s'intensifie, la plante accentue ses processus de protection ; s'installe alors la phase suivante où certains nouveaux caractères (par rapport à l'état moyen ou normal) apparaissent : c'est **la phase de résistance**. 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 (**endurcissement**). L'endurcissement est une acclimatation au stress et correspond à une étape de résistance maximale.

Les modifications induites lors de l'endurcissement ne sont pas transmises aux générations suivantes, mais la plante les garde toute sa vie.

Si l'intensité du stress reste stable, un haut degré de résistance est développé par la plante, alors s'ensuit un retour à une situation d'activité normale (**ajustement**), plus ou moins proche de celle de départ. Si l'état du stress dure très longtemps, ou si l'intensité des facteurs du stress augmente, **l'étape d'épuisement** peut se mettre en place avec apparition de dommages irréversibles dus au

facteur 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'évènement entier.

2.3 - Le statut de l'eau dans la plante

Le statut de l'eau dans la plante est l'une des composantes les plus importantes dans l'identification du degré de sensibilité des génotypes. Deux paramètres, le Potentiel Hydrique foliaire (Ψ) et la Teneur Relative en Eau (TRE) décrivent le statut hydrique des plantes (Lawlor, 1994 ; Lawlor et Cornic, 2002).

☐ **Le Potentiel Hydrique** (Ψ), ou Potentiel Chimique de l'eau, représente la mesure la plus utilisée pour caractériser le statut de l'eau. Il fournit une description thermodynamique de l'eau dans les plantes et il constitue une force motrice du mouvement de l'eau (Lawlor et Cornic, 2002). En effet, la différence du potentiel hydrique à travers la membrane (membrane plasmique, tonoplaste ou membranes d'autres organites) exprime le mouvement de l'eau à travers les différents compartiments cellulaires et détermine, donc la direction du flux. Le Potentiel Hydrique Cellulaire est inférieur à celui de l'eau pure, sa valeur algébrique est donc négative. Il peut être exprimé par unité de pression : Pa, Atm, Bar ou en $J.mol^{-1}$ (énergie par volume). Les composantes du Potentiel Hydrique peuvent être résumées par l'équation suivante (Kramer, 1983).

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

Π_s = Potentiel Osmotique.

Π_m = Potentiel Matriciel.

P = Potentiel de Turgescence de la Cellule.

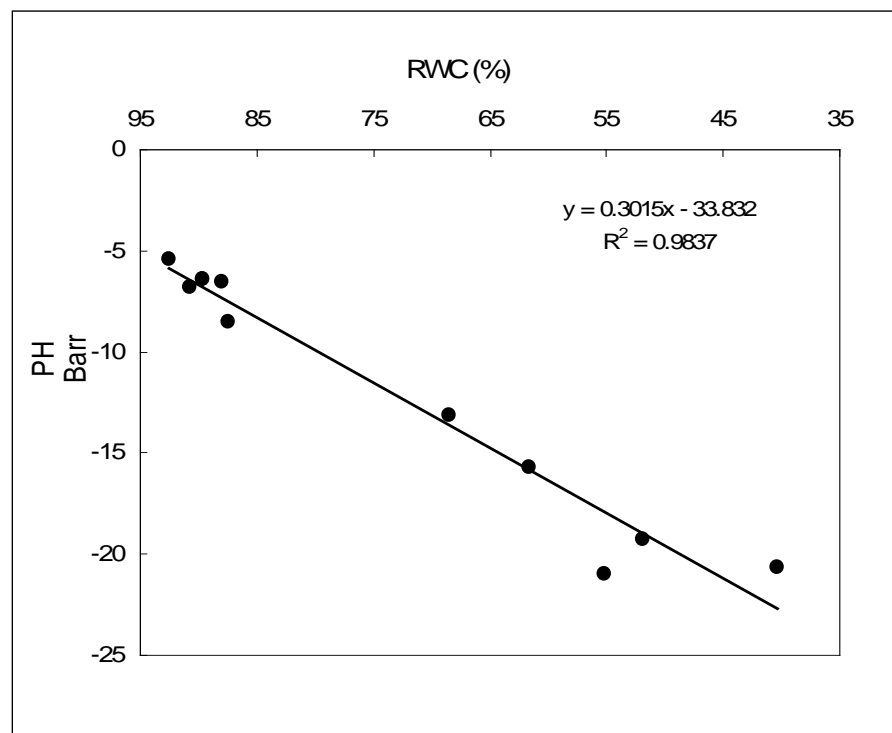
- Le Potentiel Osmotique (Π_s) mesure l'énergie de rétention de l'eau cellulaire par les substances solubles, de petit poids moléculaire (ions, sucres, acides organiques et aminés,...). Il caractérise le degré d'imbibition du protoplasme et peut influencer le fonctionnement des organites cellulaires et l'hydratation des protéines enzymatiques. Il agit sur les processus métaboliques (Kramer, 1969 et 1983). Il est invariablement négatif.
- Le Potentiel Matriciel (Π_m) est fonction des forces de rétention de l'eau dans les microcapillarités des parois cellulaires et des substances hydrophiles du cytoplasme (Kramer, 1983). Cependant, les variations du potentiel matriciel (Π_m) dans les feuilles influent très peu sur la variation de potentiel hydrique (Ψ) et de turgescence (P) tant que la déshydratation des cellules n'atteint pas un niveau critique, qui est selon Boyer (1965) de 40 % de la Teneur en Eau des feuilles.
- Le Potentiel de Turgescence (P) mesure la force des pressions exercées par la vacuole par l'intermédiaire du cytoplasme sur la paroi. Il peut être positif, nul ou, dans des cas exceptionnels, négatif.

☐ L'autre mesure du statut hydrique utilisée est la teneur en eau exprimée usuellement comme la **Teneur Relative en Eau** (TRE). C'est une mesure du volume cellulaire relatif (Lawlor et Cornic, 2002).

La TRE est une estimation appropriée du statut hydrique de la plante (Larcher, 1995). C'est également un indicateur fiable du statut hydrique pour la comparaison des tissus et des espèces (Lawlor et Cornic, 2002).

La valeur normale de la TRE est d'environ 98% dans les feuilles gorgées d'eau et transpirantes (tissus en turgescence) et 40 % dans les feuilles desséchées sévèrement (Barr et Weatherley, 1962). En règle générale, une valeur de TRE de 90 % entraîne la fermeture des stomates, la diminution de l'expansion cellulaire et de la croissance des organes. Lorsque la TRE atteint des valeurs entre 90 à 80 %, il s'ensuit des modifications dans la composition des tissus et des altérations dans les taux relatifs de la photosynthèse et de la respiration. Avec une TRE inférieure à 80 %, les changements dans le métabolisme deviennent marqués, avec arrêt de la photosynthèse, augmentation importante de la respiration et accumulation de certains composés notamment la proline et de l'acide abscissique (Lawlor et Cornic, 2002). Chez la plupart des espèces productives, la valeur typique de la TRE conduisant à la fanaison est située autour de 60 à 70 % (Barr et Weatherley, 1962).

Djebbar (2001) a réalisé une correspondance entre le potentiel hydrique foliaire (Ψ) et la TRE chez *Nicotiana sylvestris* au cours d'un stress hydrique.



Dans cette étude, le potentiel hydrique foliaire (Ψ) a été mesuré à différentes TRE des feuilles par la méthode de psychrométrie isopiétique à l'aide d'un thermocouple (appareil Wescor). La corrélation est forte, elle est de l'ordre de 0.98 (Fig. 2).

Le maintien du statut hydrique est une contrainte majeure pour la croissance et le développement des plantes terrestres. Le rôle crucial que jouent les membranes cellulaires dans le maintien du statut hydrique des plantes a été mis en avant par la découverte des aquaporines.

Les aquaporines sont un groupe de protéines membranaires hautement conservées appelées MIPs (Major Intrinsic Proteins) (Reizer et al., 1993). Elles forment des canaux qui facilitent le flux, la diffusion et les échanges de l'eau selon un gradient d'osmolarité existant à travers les membranes biologiques (Kaldenhoff et al., 1998 ; Gerbeau et al., 1999). Au niveau des membranes où elles sont localisées, elles renforcent de 10 à 20 fois l'augmentation du coefficient

de la perméabilité de l'eau de ces membranes (Chaumont *et al.*, 2001). Ces canaux d'eau sont supposés également faciliter le flux de l'eau dans les tissus stressés et permettent un recouvrement rapide de la turgescence après réhydratation (Ramanjulu et Bartels, 2002).

Les aquaporines sont regroupées en trois sous-familles basées sur l'analyse phylogénétique (Weig *et al.*, 1997) : les deux groupes majeurs de MIPs sont divisés selon leur localisation : au niveau de la membrane plasmique PIPs (Plasma-Membrane Intrinsic Proteins) ou du tonoplaste TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins) (Tyermann *et al.*, 1999). Le troisième groupe mineur chez les plantes comprend une séquence unique : NIP (noduline26- like MIPs) précédemment appelée NLM (Nod-Like MIP). Ce troisième groupe est situé au niveau de la membrane pér bactéroïde des racines du soja, pour la fixation symbiotique de l'azote (Weig et Jakob, 2000).

Plusieurs études ont noté, suite à une déshydratation, des changements dans l'expression des gènes de certaines aquaporines aussi bien au niveau et la membrane plasmique que du tonoplaste, corrélés avec l'élongation cellulaire chez *Arabidopsis thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992), *Lycopersicon esculentum*, *Zea mays* (Fray *et al.*, 1994), *Pisum sativum* (Ingram et Barlels, 1996), *Nicotiana excelsior* (Yamada *et al.*, 1997), *Helianthus Annuus* (Sarda *et al.*, 1997), *Craterostigma plantagineum* (Mariaux *et al.*, 1998), *Brassica oleracea* (Barrieu *et al.*, 1999), *Mesembryanthemum crystallinum* (Kirch *et al.*, 2000).

La phosphorylation réversible des aquaporines est un moyen de régulation de la perméabilité à l'eau. Durant le déficit hydrique, la diminution du processus de phosphorylation pourrait ralentir la perte de l'eau à partir des cellules (Bray, 1997). En effet, dans les feuilles de *Spinacea oleracea*, un faible potentiel hydrique réduit la phosphorylation de l'aquaporine PM28A de la membranes plasmique. Ceci suppose une fermeture des canaux à eau, empêchant toute perte lors d'un stress (Johansson *et al.*, 1998).

2.4 - Action du stress hydrique sur la fermeture des stomates

Les stomates permettent une sortie régulée de l'eau ; leur fermeture permet donc de limiter les pertes hydriques en cas d'un déficit en eau. L'état hydrique des feuilles participe également à la régulation de l'ouverture des stomates.

Chez les plantes vasculaires, le premier effet du déficit hydrique est la fermeture des stomates avec, comme conséquence, une réduction des échanges gazeux. Cette fermeture des stomates paraît impliquer l'acide abscissique.

Dans les feuilles non stressées, l'ABA est synthétisé continuellement à faible taux dans le cytoplasme des cellules du mesophylle foliaire à partir de la violaxanthine (synthétisée dans le chloroplaste). Ensuite, il tend à s'accumuler dans le chloroplaste où le pH est supérieur à celui du cytosol (sous forme d' ABA⁻).

Un déficit hydrique modéré cause une diminution du pH du chloroplaste et augmente celui du cytosol et de l'apoplaste (Hartung *et al.*, 1988). De tels changements pourraient entraîner la libération de l'ABA à partir des chloroplaste des cellules du mesophylle (sous forme ABAH⁺) dans l'apoplaste où il est entraîné par la transpiration vers les cellules de garde, initiant ainsi la fermeture des stomates (Guignard, 2000). Cette faible quantité d'ABA emmagasinée dans les chloroplastes sert initialement à éviter une perte d'eau.

Ultérieurement, l'ABA peut être importé vers les feuilles à partir des racines durant les périodes de déficit hydrique (Zeevaart et Creelman, 1988). En effet, il semblerait que l'assèchement du sol (Pessarkli, 1999) pourrait déclencher un signal impliquant la synthèse et l'accumulation de l'acide abscissique dans les racines à partir de la violaxanthine (synthétisée dans les leucoplastes) (Guignard, 2000). L'ABA est ensuite véhiculé par la sève brute comme «une molécule signal ». L'augmentation de la synthèse d'ABA à partir des racines sert à prolonger la fermeture des stomates (Hopkins, 1999).

Au niveau de la membrane plasmique des cellules de garde, l'ABA interagit avec un récepteur (un phospholipide ou une protéine) et entraîne une suite d'événements (Fig. 3) :

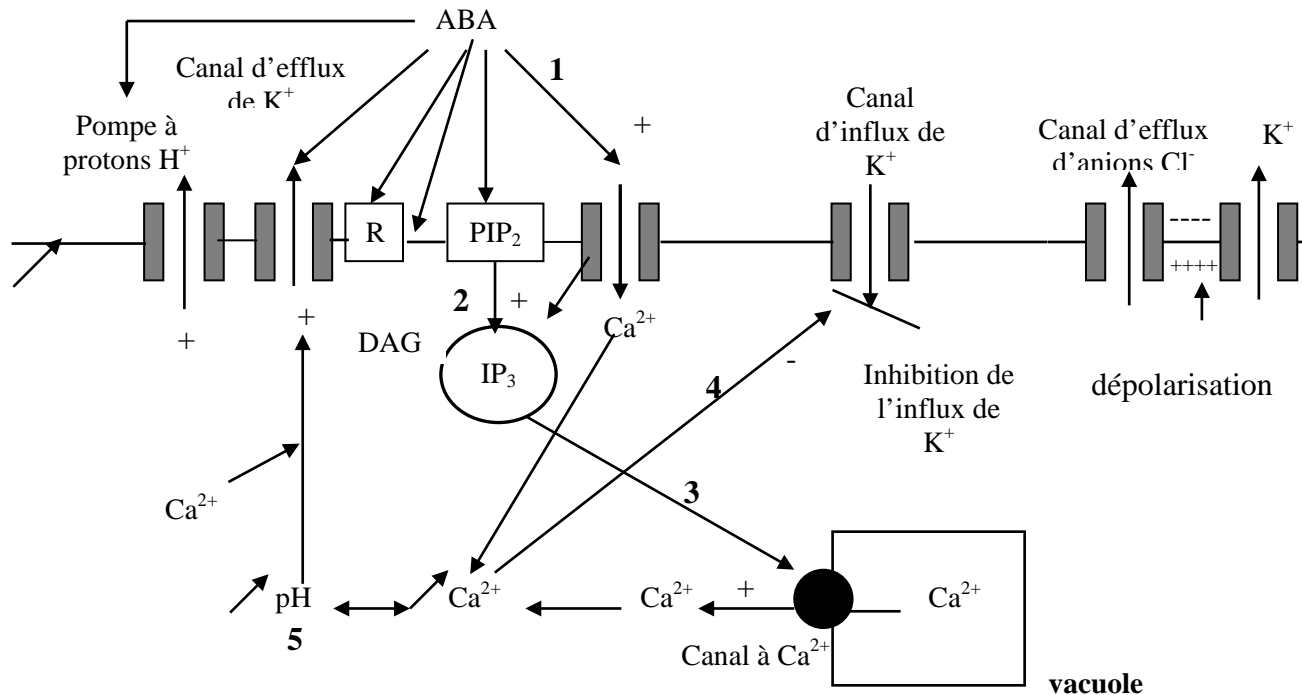


Figure 3 : Mécanismes d'action de l'acide abscissique (ABA) sur la fermeture des stomates au niveau des cellules de garde d'après Mazliak (1998).

L'ABA d'origine foliaire initie une augmentation dans la concentration en Ca^{2+} libre cytosolique par l'entrée du Ca^{2+} à travers la membrane plasmique via les canaux à Ca^{2+} (Hamilton et *al.*, 2000) (1). Cet apport en Ca^{2+} , régulé par l'ABA vers le cytosol, est déclenché quand la membrane plasmique des cellules de garde est hyperpolarisée. De l'autre côté, l'ABA augmente le niveau de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) (2) qui est produit à partir de l'hydrolyse des phospho-inositides par la phospholipase C. L' IP_3 libère le calcium à partir des réserves intracellulaires (vacuole) en régulant et ouvrant les canaux à Ca^{2+} du tonoplaste type calcium dépendant (Knight, 2000) (3). L'augmentation dans la concentration du Ca^{2+} cytosolique inhibe le flux entrant de K^+ et stimule le flux sortant de K^+ (4).

En plus de l'augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire, l'ABA cause une alcalinisation du cytosol (Irving et *al.*, 1992) (5) en agissant sur la sortie des protons H^+ vers l'extérieur via une pompe H^+ -ATPase, ce qui active les canaux d'efflux de K^+ .

Cette sortie de protons H^+ activée par l'ABA stimule les canaux anioniques. La sortie des anions dépolarise la membrane (intérieur positif), ce qui réduit encore plus l'entrée de K^+ . Ainsi, la turgescence des cellules stomatiques diminue, entraînant la fermeture des stomates (Blatt et Grabov, 1997).

2.5 - Effet du stress hydrique sur la croissance foliaire

La surface foliaire, le nombre final de cellules et le taux de division cellulaire peuvent être grandement affectés par une réduction de la teneur en eau du sol (Granier et *al.*, 2000). Cet effet dépend du temps d'exposition au déficit hydrique et de l'intensité du stress. Un stress hydrique modéré affecte le taux d'expansion durant le déficit, mais également durant une longue période après que les plantes soient réhydratées (Lecoeur et *al.*, 1995).

Dans les feuilles du grand fescue (Durand et *al.*, 1995), de blé dur (Schuppler et *al.*, 1998), de tournesol (Granier et Tardieu, 1999), de maïs (Tardieu et *al.*, 2000) et de ricin (Schurr et *al.*,

2000), le stress hydrique induit une augmentation du temps du dédoublement cellulaire, qui est lié à l'arrêt progressif de la division du noyau au cours de la phase G1 du cycle, sans changements dans la durée des phases S-G2-M du cycle cellulaire (Schuppler et *al.*, 1998 ; Granier et *al.*, 2000).

Dans les feuilles de blé, la diminution du nombre final de cellules est liée à une réduction de l'activité la protéine kinase P_{34}^{cdc2} . Cette protéine est le produit du gène *cdc2* (cell-division-cycle) (Schuppler et *al.*, 1998). Son activité est nécessaire au début des phases S et M du cycle cellulaire (Mironov et *al.*, 1999).

Par ailleurs, dans les feuilles stressées de maïs, malgré l'inhibition de l'activité de la protéine P_{34}^{cdc2} , le taux de l'enzyme reste inchangé et son activité est due à la phosphorylation de son site Tyr-15 (Granier et *al.*, 2000).

2.6 - Les pigments photosynthétiques

2.6.1- Les chlorophylles

Les chlorophylles des plantes supérieures sont représentées par la chlorophylle *a* (chl *a*) comme pigment majeur et la chlorophylle *b* (chl *b*) comme pigment accessoire. Elles sont localisées dans les membranes thylakoidales (Joyard et *al.*, 1998).

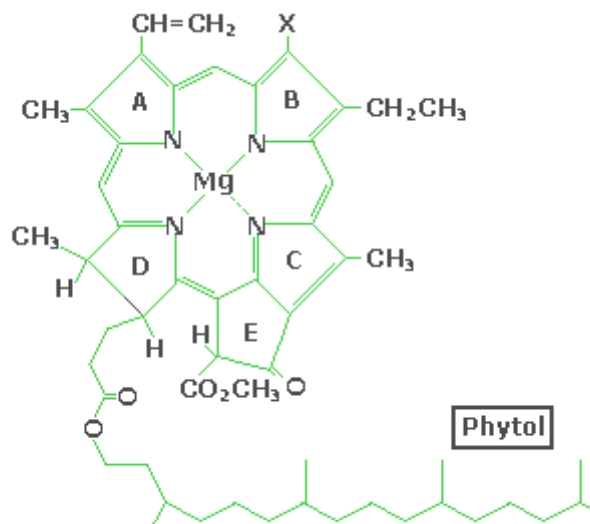


Figure 4 : Structure des chlorophylles (selon Richter, 1993).

Les chlorophylles sont un groupe de porphyrines dont les molécules comportent un noyau porphyrique à quatre groupes pyrroliques A,B,C,D reliés entre eux par un atome de Mg^{2+} . Ce noyau correspond au pôle hydrophile. Il porte deux groupement carboxyliques estérifiés, l'un par le méthanol, l'autre par un alcool en C_{20} (diterpène) correspondant au phytol. Cette longue chaîne carbonée constitue le pôle hydrophobe

La chlorophylle *a* porte un groupement methyl (CH_3) sur le noyau B, alors que la chlorophylle *b* porte un groupement formyl (CHO) (Fig. 4).

Dans les chloroplastes, les chlorophylles sont associées à des polypeptides sous forme de complexes protéines-pigments (Guignard, 2000).

L'enveloppe des chloroplastes est dépourvue de chlorophylles (Fig. 5) mais comporte de la protochlorophyllide et de la chlorophyllide (Joyard et *al.*, 1998), précurseurs des chlorophylles.

• Biosynthèse et dégradation de la chlorophylle

Quatre molécules de porphobilinogène (PBG) formées à partir du succinyl coA et la glycine s'assemblent donnant ainsi la protoporphyrine IX au niveau de l'enveloppe chloroplastique. Ensuite, il se forme un cinquième cycle (cycle E) par cyclisation d'un des acides propioniques donnant ainsi la protochlorophyllide. Dans cette phase, il y a insertion du Mg^{2+} grâce à une Mg chelatase (Fig. 5).

En présence du NADPH, cette voie continue par la réduction d'une double liaison du cycle D donnant ainsi la chlorophyllide, cette étape se réalise en présence de lumière, grâce à une enzyme: la protochlorophyllide oxydo reductase (POR), au niveau de l'enveloppe chloroplastique.

La chlorophyllide quitte l'enveloppe vers les thylakoides. Une extrémité phytol (C_{20}), synthétisée au niveau du stroma, vient s'y attacher pour donner la chlorophylle grâce à la chlorophylle synthétase située au niveau des membranes des thylakoides (Fig. 5).

Stroma

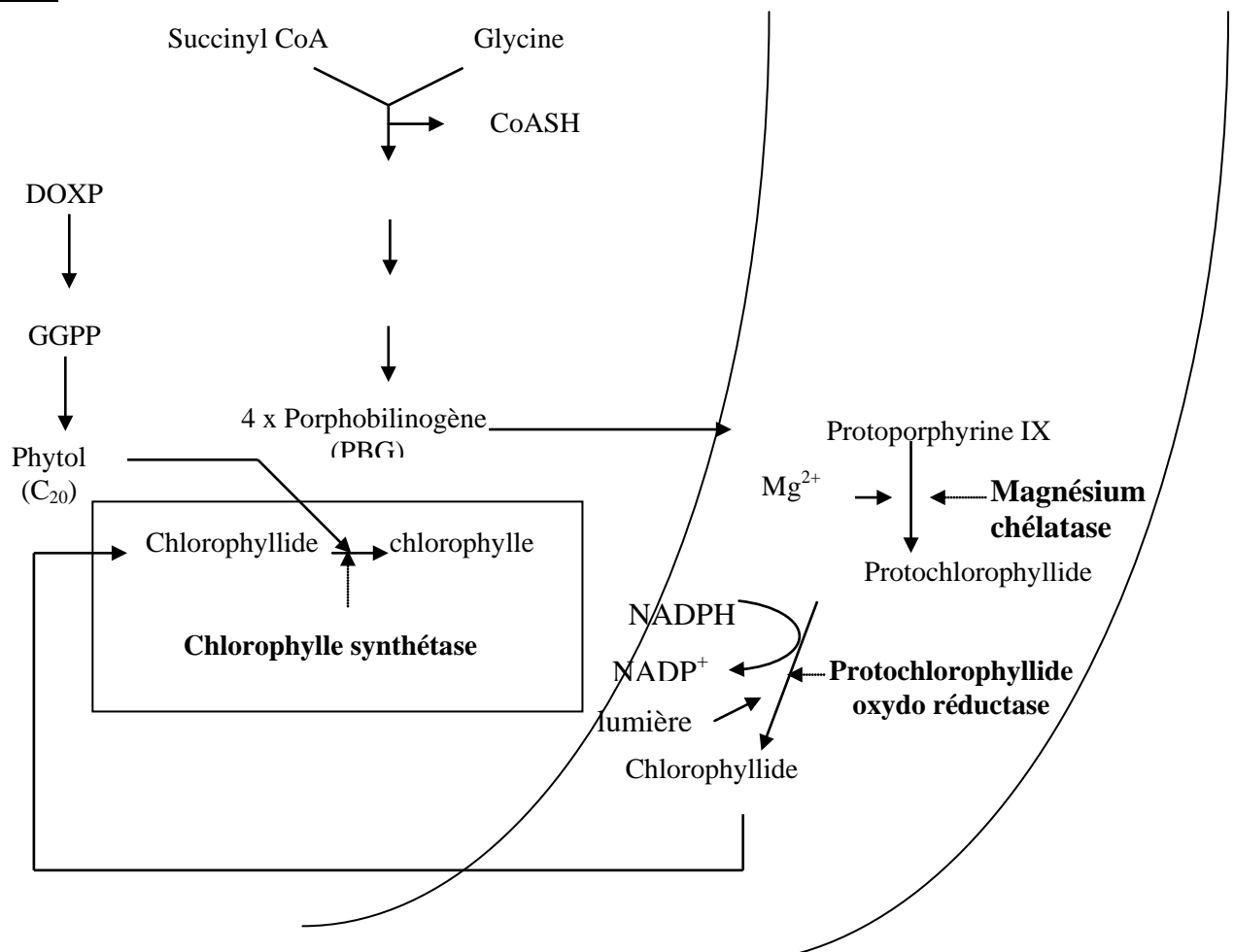


Figure 5 : Schéma de synthèse des pigments photosynthétiques (Wilkinson, 1989, modifié).

La voie de dégradation de la chlorophylle dans les feuilles sénescentes est différente de la voie de biosynthèse (Matile et *al.*, 1996). La première étape consiste en l'enlèvement de la chaîne phytol par une chlorophyllase, suivie par l'enlèvement du Mg^{2+} par une magnésium déchélatase. Ensuite, la structure porphyrine est ouverte par une oxygénase O_2 - dépendante.

2.6.2- Les caroténoïdes

Ce sont des pigments liposolubles dont le squelette carboné est constitué seulement d'unités isoprenoides. Ils interviennent en tant que pigments accessoires dans la photoprotection des chlorophylles contre la photo- oxydation et limitent la formation de molécules réactives d'oxygène (Foyer et Harbinson, 1994).

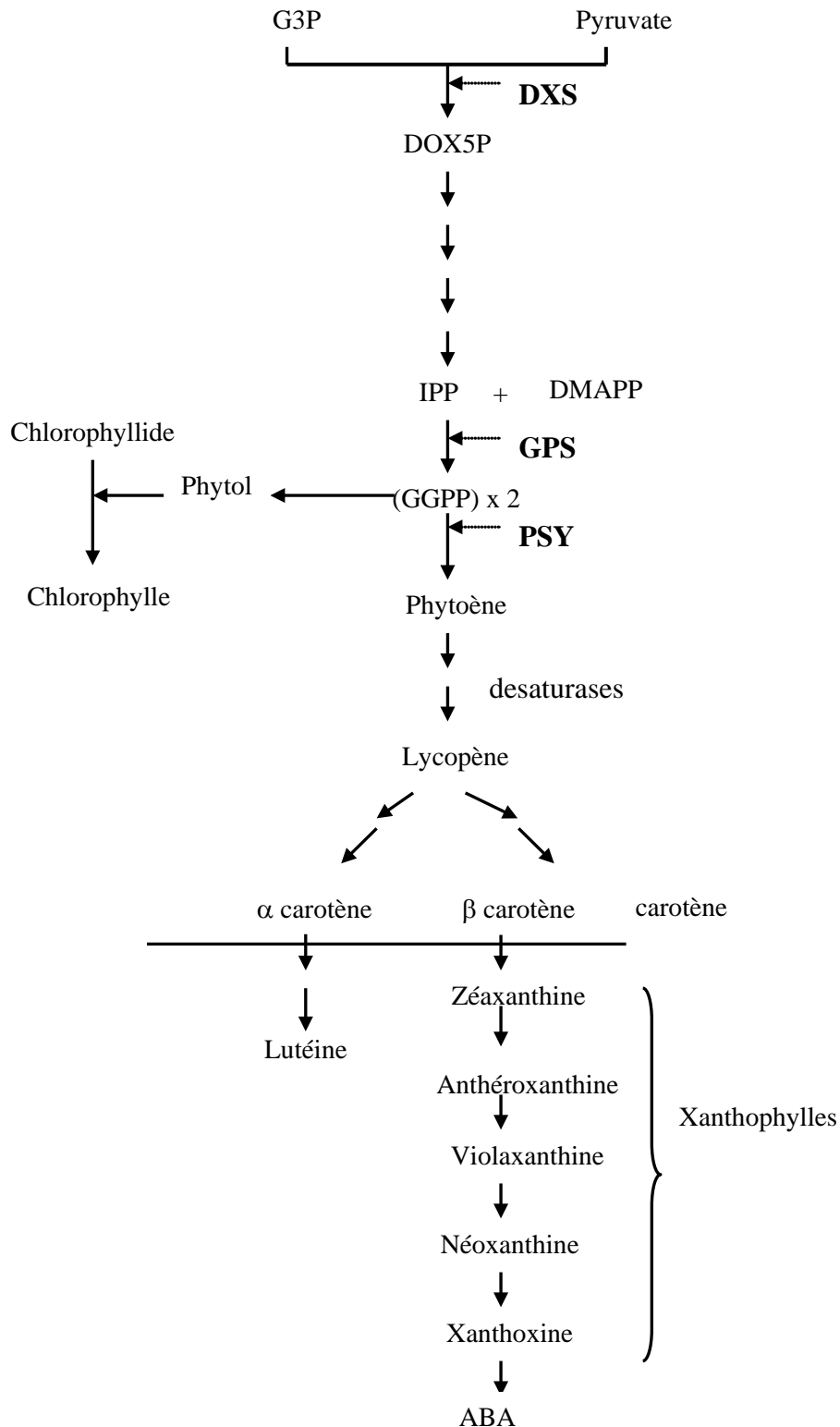


Figure 6 : Voie de biosynthèse des caroténoïdes selon Lois et *al.*, 2000 (modifié).

G3P : Glyceraldehyde-3-phosphate, DXS : 1-Desoxy-D-Xyllulose 5- Phosphate synthétase, DX5P : 1-Desoxy-D-Xyllulose 5-Phosphate, IPP : Isopentyl Pyro Phosphatase, GGPP : Geranyl Geranyl PyroPhosphate, GPS : Geranyl Pyro Phosphate Synthétase, PSY : Phytoène Synthétase ; DMAP : Dimethyl allyl pyrophosphate.

Les caroténoïdes dérivent de l'isopentenyl-pyrophosphate (IPP) synthétisé à partir du 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DX5P) dans la voie Rohmer (Fig. 6).

Ces hydrocarbures, fortement insaturés, sont représentés par les pigments non oxygénés ou carotènes (α carotène et β carotène) et les pigments oxygénés ou xanthophylles (luteine, violaxanthine, néoxanthine, zeaxanthine et anthéroxanthine) (Fig. 6).

A l'exception de la violaxanthine, laquelle est prédominante dans l'enveloppe chloroplastique, tous les caroténoïdes et les chlorophylles sont liés aux thylakoides. La violaxanthine participe aussi dans le cycle des xanthophylles.

Dans les membranes des thylakoides, ces pigments sont associés avec d'importants complexes protéines-pigments (caroténoïdes-chlorophylles) (Linchtenthaler et *al.*, 1997).

2.7 - Effet du stress hydrique sur la photosynthèse

La photosynthèse est la force motrice de la production des végétaux. Elle permet la reconstitution du potentiel thermodynamique des cellules dont le maintien à un certain niveau est indispensable. Au niveau de la plante entière, l'effet d'un déficit hydrique est toujours perçu comme la diminution de la photosynthèse et de la croissance associée à l'altération du métabolisme carboné (Iturbe-Ormaetxe et *al.*, 1998).

La teneur relative en eau dans les feuilles des plantes supérieures affecte leur physiologie et particulièrement l'assimilation du carbone et l'utilisation de l'énergie (Lawlor et Cornic, 2002). Une TRE qui passe de 100 à 90 % a peu d'effets sur le métabolisme photosynthétique (Meyer et Genty, 1999). Le seul fait qui induit une limitation de la photosynthèse est la réduction dans la diffusion du CO₂ causée par la fermeture des stomates et la diminution de la concentration en CO₂ intercellulaire (Lawlor et Cornic, 2002). Dans ce cas, l'accumulation du saccharose et l'amidon peut avoir lieu, reflétant le maintien d'une balance positive entre la synthèse et la consommation des photosynthétats en dépit de la réduction de la photosynthèse (Lawlor et Cornic, 2002).

Une chute de la TRE au dessous de 85 % diminue davantage la conductance stomatique (Lawlor et Cornic, 2002). La diminution de la fixation du CO₂ atmosphérique est significative mais réversible, due en partie à la réduction de la concentration du CO₂ et en partie à l'inhibition de l'enzyme clé du cycle de Calvin : la RubisCO (ribulose biphosphate carboxylase oxygénase) (Meyer et Genty, 1999). En effet, l'activité de la RubisCO diminue de 65% quand la TRE passe de 100 à 50 % (Tezzara et *al.*, 1999). Cette faible concentration interne du CO₂ mène à l'augmentation *in vivo* du rapport O₂ / CO₂. La Rubisco ayant une plus grande affinité vis à vis de l'O₂ va fonctionner en tant qu'oxygénase, d'où augmentation de la photorespiration (Lawlor et Cornic, 2002).

La synthèse du ribulose biphosphate et des trioses phosphates est réduite (Lawlor, 1994) alors que la consommation du saccharose par respiration continue jusqu'à ce que la teneur en carbohydrates solubles des feuilles diminue (Lawlor et Cornic, 2002).

L'une des conséquences néfastes des conditions de sécheresse est l'exposition des plantes à un excès d'énergie accompagnant l'altération des systèmes photosynthétiques. Ainsi, le flux d'électrons vers l'oxygène augmente, entraînant l'augmentation de la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) dans les chloroplastes (Smirnoff, 1993 ; Osmond et *al.*, 1997). Chez les organismes photosynthétiques, la production de ces ROS conduit à la formation de l'oxygène singulet (¹O₂^{*}), de l'anion superoxyde (O₂⁻), du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de l'hydroxyl actif (OH^{*}) (Neill et *al.*, 1999) causant des dommages cellulaires tels que la peroxydation des lipides membranaires et une modification des protéines (Olsson, 1995). Pour contrecarrer la toxicité des espèces réactives d'oxygène, un système de défense anti-oxydatif efficace existe chez toutes les plantes (Foyer et *al.*, 1994). Il inclut les constituants :

- enzymatiques : superoxyde dismutase, ascorbate peroxydase, glutathion réductase, glutathion peroxydase, glutathion transférase et catalase (Foyer et *al.*, 1994 ; Ramanjulu et Bartels, 2002) .
- non enzymatiques : glutathion, ascorbate, anthocyanes, flavones, caroténoïdes, tocophérol, quinone et phénols (Munne-Bosch et *al.*, 2001).

La réponse des antioxydants au déficit hydrique dépend de la sévérité du stress, de l'espèce et de l'âge de la plante (Mittler et Zilinskas, 1994 ; Scandalios et *al.*, 1997). Les gènes codant pour la synthèse des antioxydants enzymatiques comme l'ascorbate peroxydase, glutathion reductase et la superoxyde dismutase sont activés durant la déshydratation (Ingram et Bartels, 1996).

Les caroténoïdes sont impliqués dans la dissipation de l'excès l'énergie par une réaction cyclique des xanthophylles (Lawlor et Cornic, 2002). Dans le cycle des xanthophylles, l'excès d'énergie est dissipé par de-époxydation de la violaxanthine via l'anthéroxanthine à la zeaxanthine grâce à l'activité de la violaxanthine de-epoxydase. La réaction de de-epoxydation utilise l'ascorbate comme reductant.

L'époxydation des pigments dans le cycle des xanthophylles a lieu grâce à l'activité de la violaxanthine epoxydase et utilise le NADPH du stroma comme réductant. Les réactions d'époxydation et de de-epoxydation se déroulent simultanément à des taux très différents; cependant, elles permettent la consommation cyclique des électrons et de protons et régulent le gradient du pH transthylakoidal (Havaux et Niyogi, 1999).

2.8 - Action du stress hydrique sur le métabolisme protéique

La déshydratation des tissus végétatifs affecte également le métabolisme protéique (King et *al.*, 1992 ; Lawlor et Cornic, 2002); parallèlement, le taux de synthèse des protéines induites par le stress (déhydrines, LEAs, osmotine...) augmente (Bray, 1997).

La protéolyse chez les plantes, comme d'ailleurs la synthèse des protéines, requiert de l'énergie sous forme d'ATP (Vierstra, 1993). Dans les cellules végétales, deux voies distinctes sont engagées dans la dégradation des protéines : la protéolyse vacuolaire indépendante de l'ATP et la protéolyse cytosolique dépendante de l'ATP (Zagdanska et Wisniewski, 1998).

La dégradation dépendante de l'ATP augmente considérablement sous les conditions de déshydratation. En effet, chez *Triticum aestivum* L var milturum, la consommation de l'ATP dérivant de la respiration pour cette protéolyse compte pour environ la moitié de celle requise pour la synthèse des protéines et elle augmente de 75% suite au déficit hydrique (Zagdanska et Wisniewski, 1998).

Selon Lawlor et Cornic (2002), lors d'un stress modéré, les teneurs en acides aminés diminuent; ils sont destinés à la synthèse des protéines et au maintien de la croissance. Quand l'intensité du stress devient importante, la synthèse des protéines est inhibée et leur dégradation est accélérée (Deleu et *al.*, 1999), libérant les acides aminés libres et amides.

La réduction de la synthèse protéique suite à une contrainte hydrique peut être liée à l'expression ou à la répression de certains gènes qui sont sous le contrôle de l'ABA (Bray, 1993). Elle provoque des perturbations au niveau des systèmes enzymatiques intervenant dans la protéogénèse (Calmes et *al.*, 1985) et conduit le plus souvent à la diminution de la teneur en protéines (Zuily-Fodil, 1990). Cette inhibition de la synthèse des protéines peut être également expliquée par le non assemblage des acides aminés qui serait du à la défaillance des polyribosomes (Bradford et Hsiao, 1982), elle même liée à l'altération des ARNm entraînant la réduction de la formation des chaînes polypeptidiques (Handa et *al.*, 1983), ce qui a été observé dans les feuilles de tomate (Ho et Mishkind, 1991).

Au cours d'un déficit hydrique, il peut y avoir également un changement qualitatif dans la synthèse protéique. En effet, Heikkila et *al* (1984) ont montré que le stress hydrique conduit à la synthèse de nouvelles protéines notamment les protéines de sécheresse. Il s'agit surtout d'une protéine de 60 kDa (Dasguta et Bewley, 1984) et d'une osmotine de 26 kDa (Singh et *al.*, 1987).

☐ Les protéines de stress

- **Les Heat Shock Proteins (HSP)**

Ce sont des protéines membres d'une famille multigènes, associées à la tolérance des plantes à la dessiccation, avec un poids moléculaire situé entre 15 et 110 kDa. Elles peuvent être divisées sommairement en deux groupes : les HSP à haut poids moléculaire (high molecular weight HMW HSP) principalement HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 et les HSPs à faible poids moléculaire (LMW HSP) (Vierling, 1991).

Elles sont codées par le noyau cellulaire, synthétisées dans le cytosol et transférées jusqu'au chloroplaste et la mitochondrie (Morimoto, 1993) ou restent dans le cytosol.

Les HSP à faible poids moléculaire (16 à 30 kDa) sont des protéines dont la synthèse est récemment associée à la tolérance des plantes à la dessiccation (Wehmeyer et *al.*, 1996). Durant le stress, elles maintiennent les structures cellulaires (Lindquist et Craig, 1988) et séquestrent les ARNm inactifs (Nover et *al.*, 1989). Elles sont capables de maintenir les protéines en leur forme native, fonctionnelle. Elles interagissent avec les surfaces membranaires afin d'éviter la fuite d'ions et des solutés (Sales et *al.*, 2000), minimisent l'agrégation des protéines non fonctionnelles, ciblent les protéines destinées à la dégradation et les évacuent de la cellule (Feder et Hofmann, 1999).

- **Les Late Embryogenesis Proteins (LEA)**

Les protéines LEA représentent une large famille de protéines, initialement découvertes comme des protéines de réserve. Elles sont synthétisées abondamment durant les dernières étapes du développement de l'embryon, d'où leur nom (Dure et *al.*, 1981). Leur forte accumulation coïncide avec l'acquisition de la tolérance à la dessiccation. La présence de transcrits LEA dans les tissus végétatifs déshydratés confirme leur rôle essentiel dans la déshydratation (Kermode, 1997 ; Ramanjulu et Bartels, 2002).

Les protéines LEA sont, dans leur majorité, hydrophiles et résistantes à la chaleur (souvent solubles après ébullition). En fonction de leurs propriétés biochimiques et des similarités de séquences, les protéines LEA ont été subdivisées en 5 groupes (Cuming, 1999) dont les dehydrines qui constituent le groupe le mieux étudié. Les protéines LEA peuvent protéger les structures cellulaires spécifiques et réduire les effets de la déshydratation par le maintien d'un minimum d'eau cellulaire (Ingram et Bartels, 1996). Elles préserveraient la structure des protéines en empêchant leur dénaturation et maintiendraient ainsi l'intégrité des membranes en prenant la place des molécules d'eau disparues (Cuming, 1999). Elles peuvent intervenir dans la séquestration d'ions (Zhang et *al.*, 2000) et agir comme des molécules chaperonines (Close, 1996).

2.9 - Ajustement Osmotique

Le maintien du potentiel hydrique durant la déshydratation s'exprime par un maintien de la turgescence cellulaire rendu possible grâce à l'ajustement osmotique (Ramanjulu et Bartels, 2002).

En aidant à maintenir la turgescence foliaire, l'ajustement osmotique rend les plantes capables de garder leur stomates ouverts et continuer, de ce fait, à absorber le CO₂ pour la réalisation de la photosynthèse sous les conditions d'un stress hydrique modéré (Hopkins, 1999).

L'ajustement osmotique pour un végétal est lié à sa capacité d'accumuler au niveau cytoplasmique et de manière active certains solutés, de faible poids moléculaire et qui n'interfèrent pas avec le métabolisme cellulaire (Ramanjulu et Bartels, 2002). Ces solutés ont à pH neutre, sont non toxiques, chimiquement divers et très solubles dans l'eau. Ils sont appelés osmolytes ou solutés compatibles (Serraj et Sinclair, 2002).

Les osmolytes incluent les sucres solubles (saccharose, glucose, trehalose), polyols (mannitol, sorbitol...), les composés ammonium quaternaires, notamment la proline, ainsi que les composés sulfonium tertiaires. Leur synthèse et leur accumulation sont répandues dans la plante et leur distribution varie selon les espèces.

L'accumulation des solutés compatibles 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. Ils permettent au cytosol d'accomplir un équilibre osmotique avec la vacuole, protègent les membranes cellulaires, les protéines et la machinerie métabolique du dommage résultant de la déshydratation (Rathinasabapathi, 2000).

Bien que l'ajustement osmotique paraît être une réponse générale au stress hydrique, ce ne sont pas toutes les espèces qui sont capables d'ajuster leur concentration en solutés. Il serait un caractère monogénique récessif et spécifique à certaines espèces seulement. *Vigna unguiculata*, espèce incapable d'ajustement osmotique, évite la dessiccation par la fermeture des stomates, ce qui permet le maintien d'un potentiel hydrique relativement élevé (Hopkins, 1999).

- **La Proline libre**

Les acides aminés sont des facteurs clés dans le métabolisme et le développement des plantes supérieures. La proline est le plus stable des acides aminés, la plus largement distribuée chez les plantes (Bonhert et Sheveleva, 1998). Plusieurs travaux ont montré une corrélation entre l'accumulation de la proline et la tolérance des plantes au déficit hydrique notamment.

Certains auteurs supposent que son accumulation est associée à sa capacité d'agir comme un composant de la tolérance au stress des plantes. En effet, elle joue un rôle principal dans l'ajustement osmotique (Hare et *al.*, 1998), comme protecteur des systèmes enzymatiques et des membranes (Albouchi et *al.*, 1997), comme une source énergie, de carbone et d'azote, permettant un recouvrement après le stress (Zhang et *al.*, 1997). D'autres auteurs pensent que l'augmentation du niveau de la proline peut être un symptôme de stress (Hanson et Hitz, 1982) qui résulte de déséquilibres dans d'autres voies métaboliques (Perèz-Alfoncèa et Larher, 1995).

Chez les plantes, la proline est synthétisée de *novo* dans le cytoplasme principalement à partir du glutamate (Glu) *via* deux intermédiaires : l'acide glutamique γ -semi aldéhyde (GSA) et Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) suite à deux réductions successives, lesquelles sont catalysées par la P5CS (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase P5CS ; EC2.7.2.11/12.1.41) dans la première étape et la P5CR (Δ^1 -pyrroline-5pyrroline réductase : P5CR ; EC105.1.2) dans l'étape finale

(Fig. 7). La P5CS est fortement régulée par retro-inhibition ; la biosynthèse de la proline ne peut résulter que du relâchement de l'inhibition exercée par feedback sur son activité.

La production de la proline peut se faire également à partir de l'ornithine (dérivant de N-Acetyl-glutamate). Dans ce cas, la conversion en proline suit deux parcours de transamination : l'un aboutit à l'acide glutamique γ -semi-aldéhyde pour suivre la voie glutamate, l'autre voie donne l'acide Keto-amino valérique qui subit une cyclisation et une réduction donnant à la fin de la proline (Asthon et *al.*, 1993). Ces réactions sont catalysées par l'ornithine δ -amino transférase (SOAT) et la P5CR.

Chez les jeunes plantules d'*Arabidopsis thaliana*, les deux voies : glutamate (glu) et ornithine (orn) entraînent une accumulation accrue de la proline (Roosens et *al.*, 1998) alors que dans les plantules adultes, l'augmentation dans le taux de la proline libre est spécialement due à

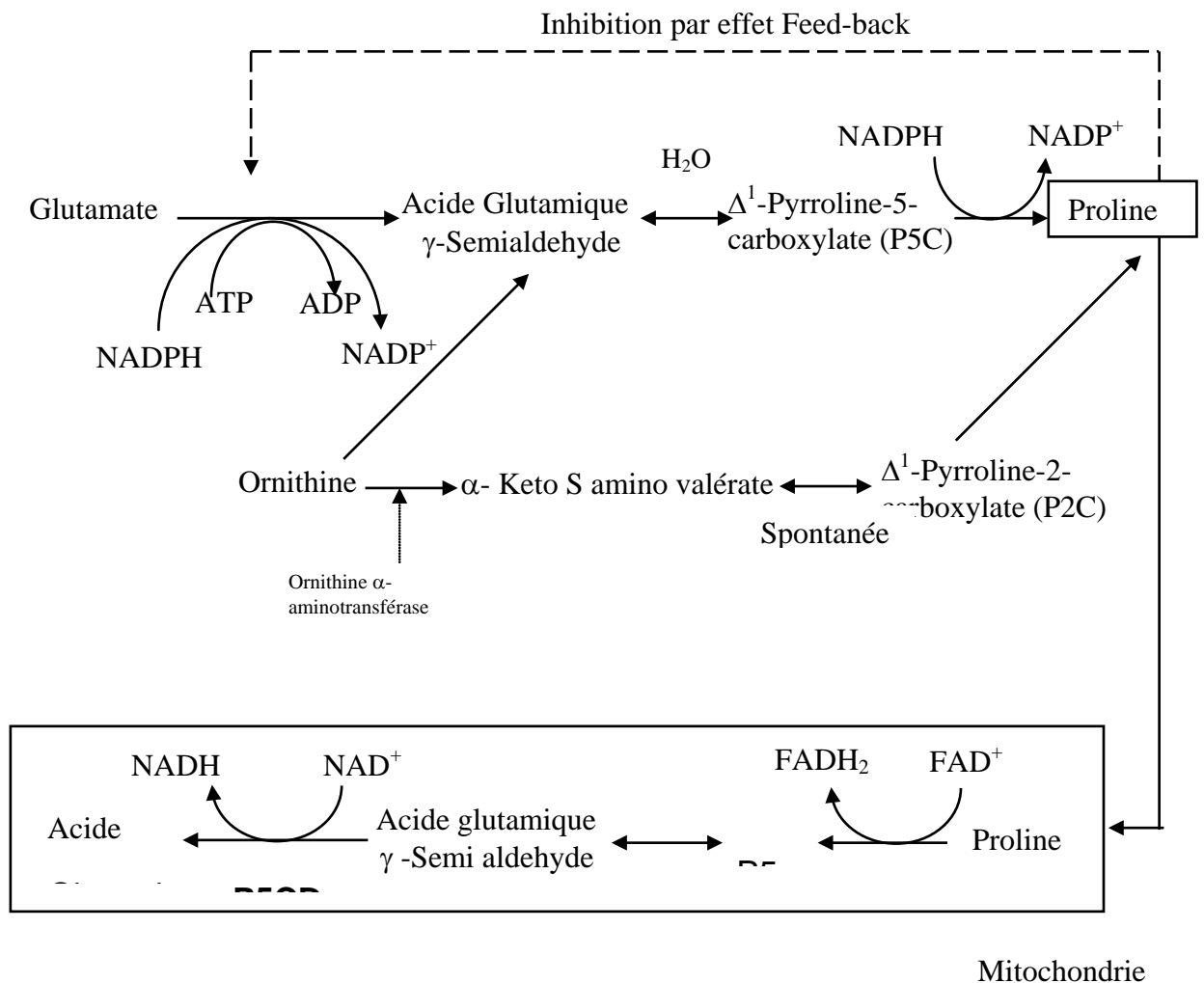


Figure 7 : Voies de biosynthèse et de dégradation de la proline chez les plantes selon Asthon et *al.*, 1993 ; Iyer et Caplan (1998)

l'activité d'enzymes de la voie glutamate (Yoshiba et *al.*, 1997), la voie ornithine étant réprimée (Hua et *al.*, 1997 ; Roosens et *al.*, 1998).

La proline est dégradée par l'action de séquences enzymatiques de la proline deshydrogénase oxydase (PDH ; EC1.5.99.8) qui oxyde la proline en Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) dans la mitochondrie et la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate deshydrogenase (P5CDH ; EC1.5.1.12) qui convertit le Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) en glutamate (Peng et *al.*, 1996) (Fig. 7).

Les mécanismes contrôlant le niveau de la proline durant la déshydratation sont à la fois la régulation des gènes de l'enzyme de biosynthèse (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase) et de dégradation (proline déshydrogénase).

La P5CS est codée par 2 gènes différemment régulés : AtP5CS1 et AtP5CS2. La stimulation de la biosynthèse de la proline sous l'effet de la déshydratation est corrélée avec une forte expression de ces gènes, et à des niveaux élevés de mRNA correspondant à une grande activité de l'enzyme (Yoshida *et al.*, 1999). En effet, les niveaux de transcrits codant la P5CS sont rapidement induits à un haut niveau après déshydratation (Igarashi *et al.*, 1997). De même, les transcrits et l'activité P5CS (Murahama *et al.*, 2001) sont importants suite à la déshydratation. *A contrario*, les transcrits de la proline déshydrogénase (PDH) sont indétectables et son activité diminue fortement suite à la déshydratation (Kiyosue *et al.*, 1996). En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, le blocage de l'activité de l'enzyme par un gène antisens (At PDH) favorise l'apparition de mutants capables d'accumuler de fortes quantités de proline en réponse au stress hydrique et le taux de proline demeure plus fort même après la levée de la contrainte (Xin *et al.*, 1998).

Le transport de la proline vers les organes stressés augmente en cas d'un déficit hydrique et nécessite des transporteurs (Verslues et Sharp, 1999). Ils sont au nombre de deux : l'un s'exprimant indépendamment du stress (ProT1) et l'autre fortement induit par le stress (ProT2) (Schwacke *et al.*, 1999). En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, 2 cDNA codant pour les transporteurs de proline ont été identifiés tels que ProT2 dont la concentration augmente quand la plante est sujette au stress hydrique (Hong *et al.*, 2000).

- **Les sucres solubles**

La production des sucres par la photosynthèse est l'activité la plus importante de la vie des plantes. Le saccharose est le produit principal de la photosynthèse et la principale forme de transport de carbohydrates (Weber *et al.*, 1995). Son accumulation peut potentiellement jouer un rôle direct dans l'osmorégulation et comme protectant des macromolécules et des membranes (Bray, 1997).

La synthèse du saccharose est activée largement par l'augmentation coordonnée de l'activité de deux enzymes: la saccharose phosphate synthétase (SPS ; EC.2.4.14) et la saccharose 6' phosphate phosphatase (SPP) (Fig. 8).

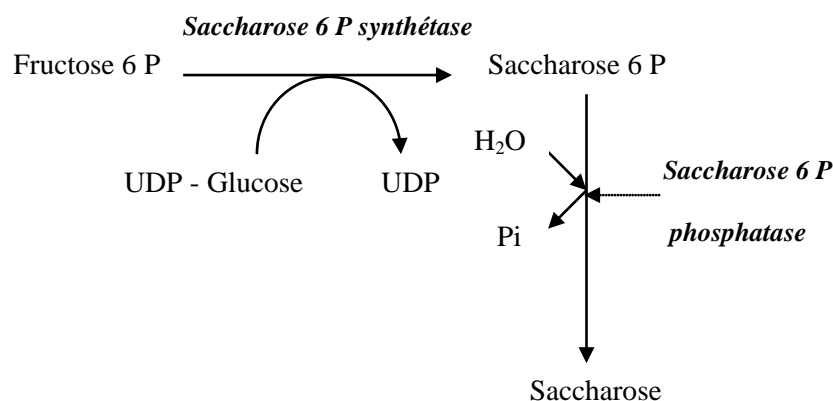


Figure 8 : Voies de biosynthèse du saccharose

L'accumulation du saccharose corrélée avec l'activation de la SPS, suite au déficit hydrique, a été rapportée dans les feuilles de certaines espèces comme *Phaseolus vulgaris* (Castrillo, 1992), *Spinacea oleracea* L, *Oryza sativa*, *Eucalyptus globulus* (Garcia et al., 1997) ainsi que dans les tubercules de *Solanum tuberosum* (Geigenberger et al., 1997).

L'importance de la SPS dans la synthèse du saccharose a été confirmée par des manipulations génétiques de l'enzyme. Ainsi la surexpression de l'enzyme SPS de *Zea mays* chez *Lycopersicon esculentum* induit l'augmentation de la synthèse du saccharose et l'augmentation du rapport saccharose / amidon dans les feuilles alors que l'expression antisens de la SPS dans les plants de *Solanum tuberosum*, supprime la stimulation de la synthèse du saccharose induite par la déshydratation (Geigenber et al., 1997) et augmente le flux de carbone vers la synthèse de l'amidon et les acides aminés (Krause et al., 1998).

Certaines plantes soumises aux conditions de déshydratation sont caractérisées par une accumulation importante d'hexoses (glucose, fructose...), associée à une augmentation de l'activité de l'invertase acide vacuolaire, enzyme clivant irréversiblement le saccharose en glucose et fructose (Pelleschi et al., 1999) dans les tissus où l'activité de la saccharose phosphate synthetase est faible ou basse (Vanden. Ende et Van Laere, 1995). C'est le cas des feuilles de *Phaseolus vulgaris* (Castrillo., 1992), *Saccharum sp* (Du et al., 1998), *Zizyphus mauritiana* (Clifford et al., 1998) et de feuilles matures de *Zea mays* (Kim et al., 2000).

En effet, la suppression de l'activité de l'invertase acide par un ARN antisens augmente la teneur en saccharose dans les fruits de *Lycopersicon esculentum* (Klann et al., 1996) et réduit l'accumulation des hexoses dans les tubercules de *Solanum tuberosum* (Zrenner et al., 1996). L'activation de l'invertase acide soluble par la déshydratation permet l'accumulation des hexoses solubles provenant de la dégradation du saccharose stocké au niveau de la vacuole.

La dégradation du saccharose peut être également catalysée par la saccharose synthetase (SS EC 24.1.13) ou UDP-glucose : D-Fructose-2 α -Glucosyltransferase qui catalyse le clivage réversible du saccharose en UDP-Glucose + Fructose.

Deux isoformes de la SS (SS1 et SS2) ont été décrites chez plusieurs plantes supérieures. Ces protéines sont codées par 2 gènes différents (Koch, 1996). L'expression des gènes de SS est régulée durant la déshydratation (Dejardin et al., 1999). En réponse à la déshydratation, les deux transcrits s'accumulent dans les feuilles de *Phaseolus vulgaris* (Castrillo, 1992) et dans les feuilles et les racines de *Craterostigma plantagineum* (Kleines et al., 1999).

Au cours d'un déficit hydrique, les sucres solubles proviendraient également de l'hydrolyse de l'amidon en glucose. En effet, la quantité d'amidon foliaire diminue pendant la période de stress et augmente à nouveau lorsque l'eau redevient abondante (Bensari, 1989). Le déficit hydrique semble agir sur l'activité alpha-amylasique qui est l'enzyme clé dans le processus de dégradation de l'amidon (Bensari, 1989).

L'accumulation de ces hexoses permet un ajustement osmotique, qui pourrait contrecarrer la déshydratation cellulaire (Pelleschi et al., 1997).

2.10 - Intégrité membranaire

La matière vivante dépend de deux processus : la synthèse des molécules appropriées et leur assemblage dans des structures organisées (Hoekstra et *al.*, 2001). Pour leur organisation cellulaire, l'effet hydrophobe est crucial. L'eau est une force dynamique qui assemble les phospholipides des membranes biologiques et des protéines en leur conformation native fonctionnelle.

Une diminution de l'eau cause la réduction du volume cellulaire et entraîne un entassement des composés cytoplasmiques. Les contenus cellulaires deviennent alors très visqueux, augmentant ainsi la chance des interactions moléculaires qui peuvent causer la dénaturation des protéines et des membranes.

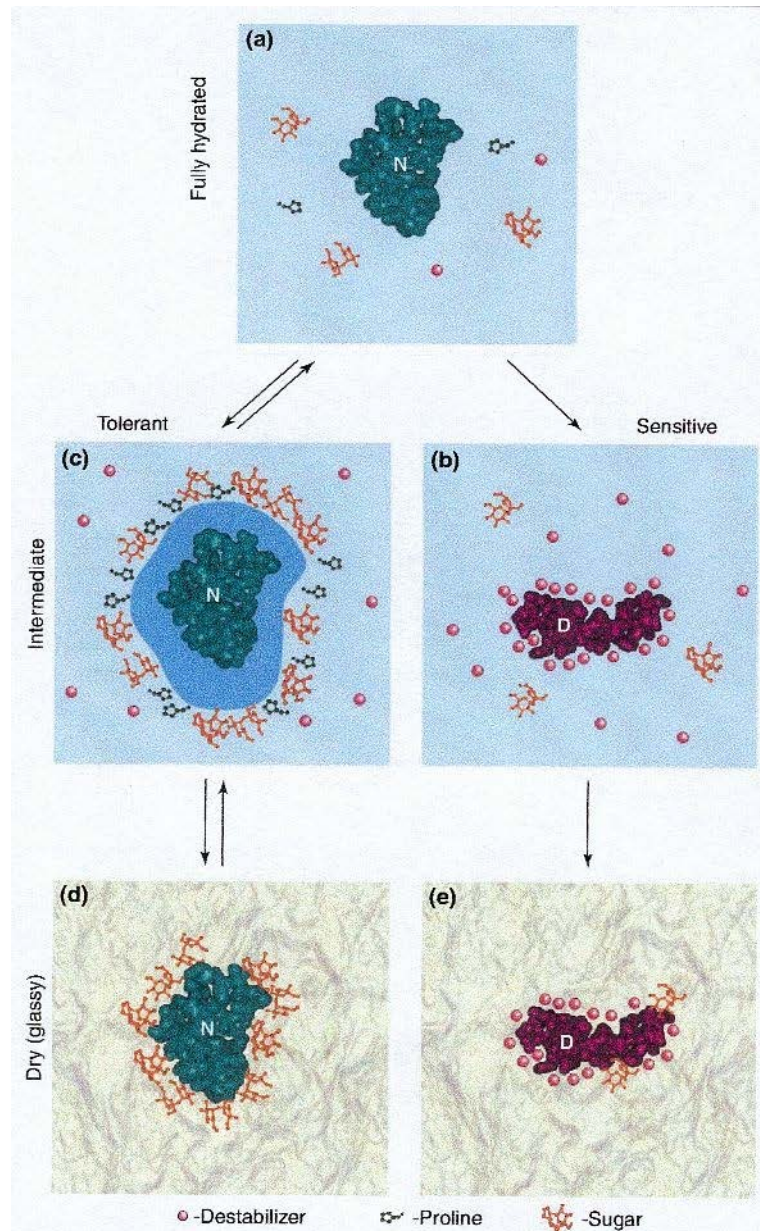


Figure 9 : Mécanismes de stabilisation de la structure des protéines à différentes étapes de la déshydratation chez les variétés sensibles et résistantes (Hoekstra et *al.*, 2001).

Plusieurs composés dont la proline et les sucres solubles ont la propriété de stabiliser les protéines en leur forme native fonctionnelle et les membranes biologiques en leur phase fluide fonctionnelle (Hoekstra et *al.*, 2001).

La stabilisation de la structure des protéines dépend du degré du stress et de la performance de la plante à lui faire face (Fig. 9).

Dans les cellules d'espèces végétales pleinement hydratées (**a**), la forme en repli native (N) des protéines natives est thermodynamiquement favorable et fonctionnelle. L'entassement des molécules suite à une diminution de l'eau augmente la probabilité de l'interaction des solutés cytoplasmiques avec la surface des protéines. Dans les cellules d'espèces sensibles au déficit hydrique (**b**), le manque de solutés compatibles (proline ou sucres) cause l'établissement de liaison préférentielle avec des molécules destabilisatrices (parmi elles certains ions) qui mènent à la déstabilisation de la protéine, causant ainsi sa dénaturation.

Dans les cellules d'espèces tolérantes (**c**), la présence de solutés compatibles permet dans un premier temps une rétention de l'eau autour de la surface de la protéine (l'eau est symbolisée par une bande bleue). Ainsi, les protéines gardent une conformation native, fonctionnelle. Avec une diminution plus importante de l'eau autour de la surface de la protéine, les molécules de solutés compatibles, notamment les sucres qui étaient exclus de la surface de la protéine remplacent l'eau par l'établissement de liaisons hydrogènes, stabilisant ainsi la structure de la protéine dans sa conformation native, fonctionnelle des cellules d'espèces tolérantes (**d**), alors que dans les cellules d'espèces sensibles, déshydratées (**e**), la conformation dénaturée, observée au préalable reste fixe avec l'intensification du stress.

Le maintien de la structure fluide fonctionnelle de la membrane dépend du degré du stress et la capacité du végétal à lui faire face (Fig. 10).

Dans les cellules pleinement hydratées (**a**), les lipides membranaires sont dans une phase liquide cristalline assurant à la membrane une fluidité et donc un fonctionnement optimum. Avec une diminution de l'eau (une teneur en eau intermédiaire), la présence de solutés compatibles (notamment les sucres) dans les cellules d'espèces tolérantes (**b**), garde la surface de la membrane hydratée (l'eau est symbolisée par une bande bleue) et empêche ainsi sa rigidification. Dans le cas des plantes sensibles (**c**), l'absence de ces solutés entraîne une augmentation dans la concentration des composés amphiphiles cytoplasmiques et leur diffusion au travers de la bicouche de phospholipides, causant ainsi une perturbation des membranes.

Avec une diminution plus importante en eau, les molécules de sucres dans les cellules d'espèces tolérantes (**d**) remplacent l'eau disparue des membranes et établissent des liaisons avec la surface des membranes, assurant ainsi le maintien de l'espace entre les molécules de phospholipides, la bicouche reste dans une phase liquide - cristalline alors que dans les cellules d'espèces sensibles (**e**), l'absence de l'eau et de sucres, mène à un resserrement et un entassement des molécules de phospholipides, conduisant ainsi à un changement de phases (phases gel), qui mènera fortement à des dommages membranaires irréversibles.

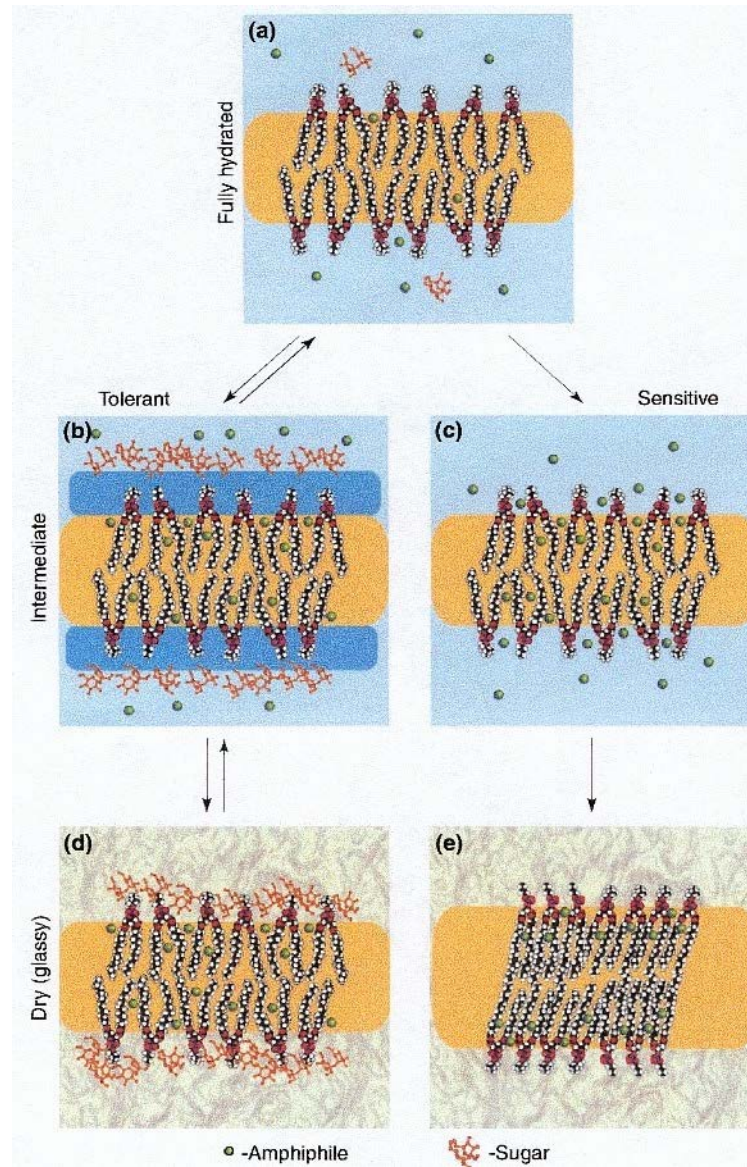


Figure 10 : Effet des différentes étapes de déshydratation sur l'intégrité de la membrane chez des variétés sensibles et résistantes (Hoekstra et *al.*, 2001).

2.11 – Signalisation

Chez les plantes, la déshydratation induit une panoplie de réponses physiologiques, biochimiques et moléculaires (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

- *Perception du signal*

La perception du signal de stress constitue l'étape initiale et importante qui précède l'induction de gènes en réponse à la déshydratation (Fig. 11). Elle est liée soit au changement du potentiel osmotique à travers la membrane plasmique causé dans certains cas par la diminution de la turgescence (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 1997) (1), ou le changement de la tension du cytosquelette (Mizoguchi et al., 1997) (2) ou par un système de 2 composés Histidine-Kinases (3) qui fonctionnent comme des osmocapteurs (*osmosensors*) et qui entraînent des changements mécaniques au niveau de la membrane plasmique durant la déshydratation (Urao et al., 1999 ; Ramanjulu et Bartels, 2002).

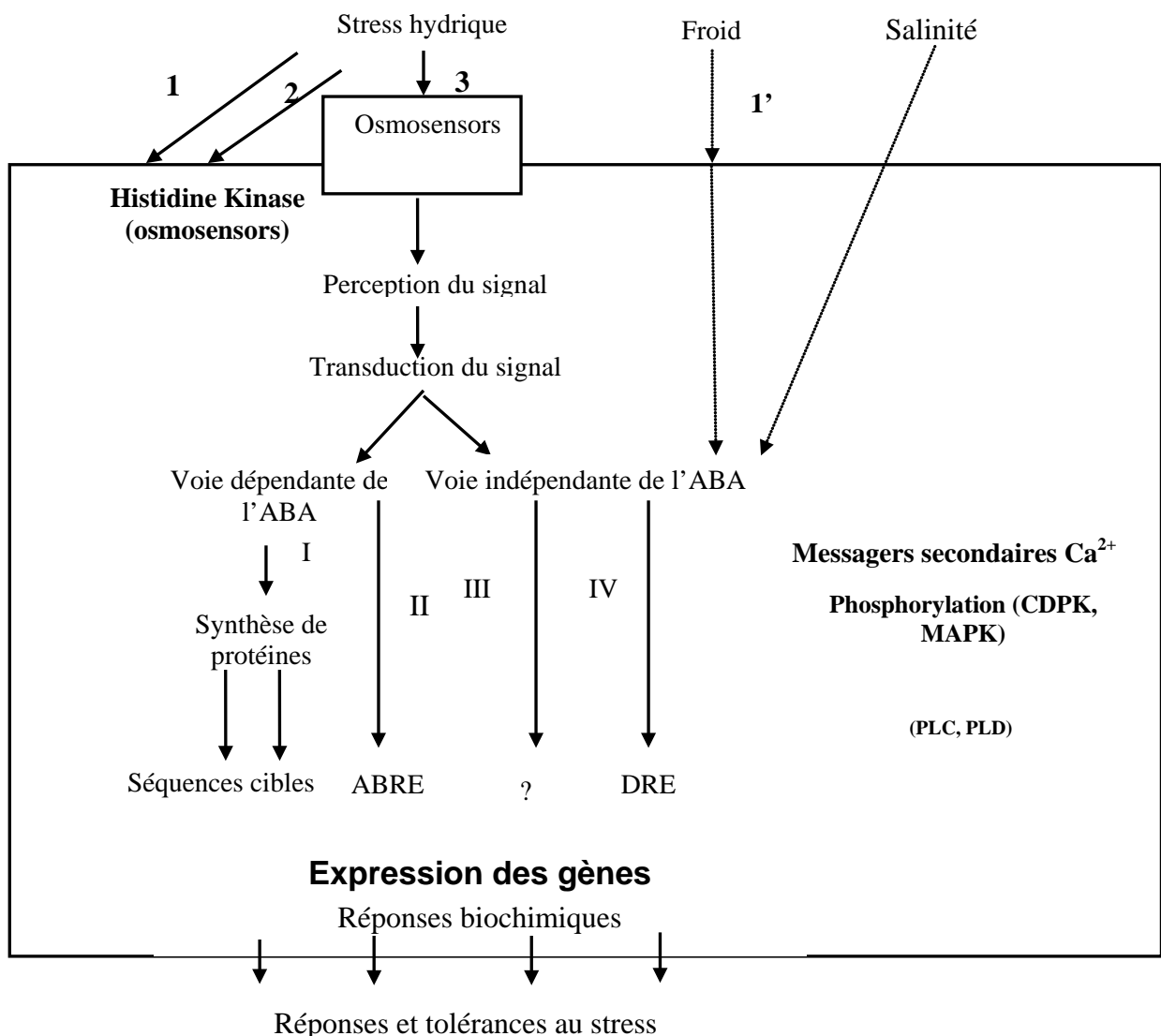


Figure 11 : Messagers secondaires et facteurs impliqués dans la perception et la transduction du signal en réponse au stress hydrique.

PLC : Phospholipase C ; PLD : Phospholipase D.

Planche : Shinozaki K et Yamaguchi-Shinozaki K, 1997 et 2000 (modifiée)

1' : Changement de température.

1 : Changement du potentiel osmotique.

2 : Changement de tension du cytosquelette.

3 : Osmosensors (Histidine-kinases).

- **Transduction du signal**

Suite à la perception du signal, différents facteurs sont impliqués dans sa transduction : l'ABA (Ramanjulu et Bartels, 2002), le Ca^{2+} (Knight, 2000), les protéines Kinases Ca^{2+} dépendantes (Bonetta et Mc Court, 1998), la thréonine Kinase de type Serine (Hirt, 1997), les phospholipases C et les phospholipases D (Hirayama et *al.*, 1995 ; Wang, 1999).

Entre la perception du signal et l'expression des gènes, au moins quatre voies de transduction de signal existent (I-IV) et fonctionnent pour l'activation des gènes (Fig. 11). Deux de ces voies sont "ABA- dépendantes" (I et II) tandis que les deux autres sont "ABA- indépendantes" (III et IV) (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Dans l'une des voies dépendantes de l'ABA (I), l'expression des gènes requiert la biosynthèse de facteurs protéiques ou facteurs de transcription. La deuxième voie (II) n'exige pas la synthèse de protéines pour l'expression des gènes. Ces gènes présentent un élément de réponse à l'ABA dans leurs région motrice (Eléments de Réponses à l'ABA ou ABREs) où l'ABA contrôle directement le système de transcription.

Pour l'expression des gènes indépendante de l'ABA, il existe deux systèmes régulateurs différents selon le type de stress impliqué. Le premier (IV) est à DRE (Elément de Réponse à la Déshydratation), induit par les conditions de sécheresse, de froid et de salinité ; le second (III) est contrôlé seulement par les conditions de déshydratation, ce qui suggère l'existence d'un autre système régulateur de réponse au stress.

- **Expression du signal**

Les gènes induits par la déshydratation sont décrits au niveau transcriptionnel (Bray, 1997). Ils ont un rôle protecteur des cellules contre le déficit hydrique (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Les produits de ces gènes sont classés en 2 groupes (Fig. 12) :

- Le premier groupe inclut les protéines fonctionnelles : ce sont les protéines impliquées dans le mouvement de l'eau à travers les membranes (Water Channel Protein), les enzymes requises pour la biosynthèse d'osmoprotectants (sucres, protéines), les protéines dont le rôle est de protéger les macromolécules (LEAs protéines, osmotines, protéines antigel, chaperonines et les protéines liées aux mRNA), les protéases pour le turnover des protéines (protéases thiol, ubiquitines) et les enzymes de détoxification (SOD, catalase, glutathion-S-transferase, epoxide soluble, ascorbate peroxydase).
- Le second groupe contient les facteurs protéiques impliqués dans la régulation de la transduction du signal et de l'expression des gènes (protéines régulatrices) qui, probablement, fonctionnent dans la réponse au stress : protéines kinases, facteurs de transcription, phospholipase C et 14-3-3 protéines, etc.....

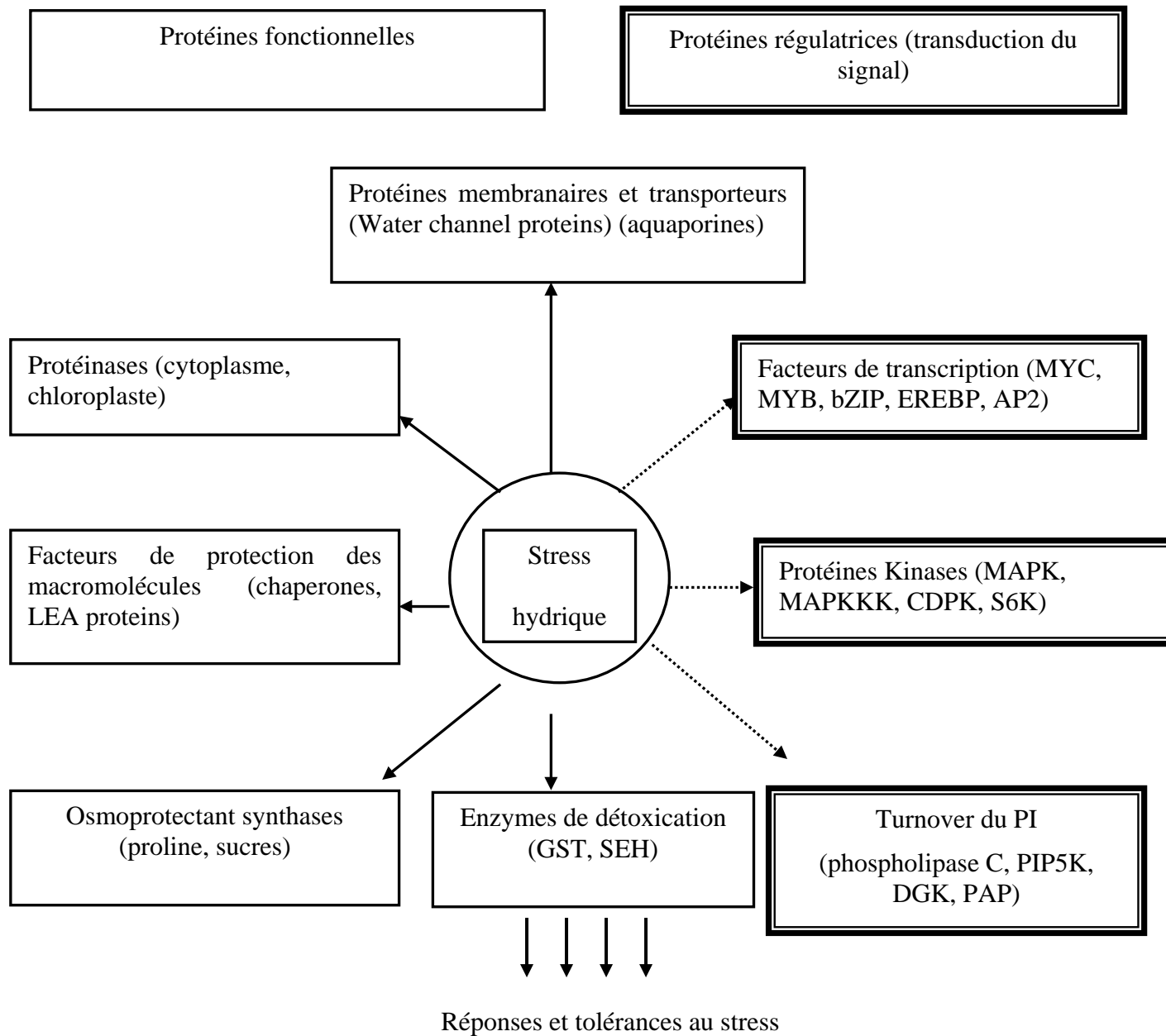


Figure 12 : Réponses des gènes induits par le stress hydrique et leur possible fonction dans la tolérance et la réponse au stress.

CDPK : Protéine Kinase Calcium dépendante ; DGK : Diacyl Glycérol Kinase, GST : Glutathione-S-transférase ; LEA : Late Embryogenesis Abundant ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase; MAPKKK : Mitogen Activated Protein Kinase kinase Kinase; PAP : Phosphate Acidephosphatidique Phosphatase ; PIP5K : Phosphatidyl Inositol-4-Phosphate-5-Kinase ; SEH : HydrolaseEpoxide Soluble ; S6K : Protein S6 Kinase Ribosomal ; Pi : Phosphatidyl Inositol.

Planche et source : Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki et *al.*, 1999.

3 - Matériels et méthodes

3.1 - Matériel végétal

Les graines de Tabac (*Nicotiana sylvestris*) ont été fournies par l'Institut de Biotechnologies des Plantes (IBP) de l'Université Paris Sud d'Orsay (France).

3.1.1 - Mise en culture des graines et traitement

Les graines de tabac sont mises à imbiber dans de l'eau distillée pendant deux heures, puis à germer dans des bacs sur de la vermiculite lavée à l'eau courante et rincée à l'eau distillée (Photo 3A).

L'arrosage des bacs a lieu régulièrement et alternativement (1/2) avec de l'eau et un milieu nutritif KNOP.



Photo 3 : Mise en germination des graines de *Nicotiana sylvestris* (A) et plantules de *Nicotiana sylvestris* âgées de 2 mois (B).

Après deux mois de croissance, les plantules de Tabac sont transférées dans des pots contenant du terreau constitué de tourbière blonde (Photo. 3B).

3.1.2 - Application du stress

Après six mois de croissance, les plantes de Tabac sylvestre sont séparées en deux lots (Photo 4).

- ◆ Les plantes du 1^{er} lot sont considérées comme étant des plantes témoins et sont quotidiennement arrosées avec de l'eau.
- ◆ Les plantes du 2^e lot subissent un arrêt d'arrosage pendant 38 jours. C'est le lot des plantes stressées.



Photo 4 : Plantes de *Nicotiana sylvestris* après 6 mois de croissance.

3.2 - Méthodes utilisées

3.2.1 - Mesure de la teneur en eau du sol

100 g de sol frais sont mis à l'étuve à 60 °C pendant trois jours, puis pesés régulièrement jusqu'à l'obtention d'un poids constant : c'est le poids sec.

La teneur en eau du sol est calculée selon la relation :

$$\text{Eau du sol (\%)} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PF}} \times 100$$

PF : Poids du sol frais.

PS : Poids sec du sol.

3.2.2 - Statut hydrique de la feuille

• Mesure de la Teneur Relative en Eau (TRE ou RWC)

L'étude est réalisée toujours à la même heure de la journée (10h du matin).

Les expériences sont réalisées sur 4 disques foliaires de 1.4 cm² de diamètre, prélevés sur la 4^{ème} feuille selon la méthode de Clarke et Mc Caig (1982a). La teneur relative en eau est calculée selon la formule établie par Ladigues en 1975 (In Turner, 1986). Elle consiste à déterminer le pourcentage d'eau présent dans les disques foliaires découpés et trempés dans l'eau distillée.

Les disques foliaires sont pesés séparément (PF). Ils sont ensuite mis dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau distillée et placés pendant 24 heures dans une chambre froide, puis sont pesés de manière à avoir le poids à la turgescence (PT).

Le poids de la matière végétale sèche (PS) est déterminé après dessiccation des disques foliaires pendant 48 heures à 60°C.

La TRE est ainsi calculée :

$$\text{TRE (\%)} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PT} - \text{PS}} \times 100$$

• Teneur en eau des feuilles

Elle est mesurée sur 4 échantillons. Elle se détermine par la différence de la masse de la matière végétale fraîche à celle de la matière végétale sèche obtenue par dessiccation après un passage de 48 heures à 60°C à l'étuve.

$$\text{Teneur en eau des feuilles (\%)} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PF}} \times 100$$

• Mesure de l'efflux d'ions

L'efflux d'ions est estimé par la mesure de la conductivité sur des disques foliaires (5) de 1.4 cm², de poids variable tout au long de l'expérimentation. Ces disques sont prélevés sur la même feuille (4^e feuille) selon la méthode de Trémolières *et al.*, (1989).

La conductivité est toujours mesurée à la même heure de la journée (10h du matin), à l'aide d'un conductimètre de terrain PHYWE.

Les disques foliaires prélevés sur chaque plante sont partagés en 2 lots :

- Les disques du 1^{er} lot sont mis à flotter dans 20 ml d'eau distillée. La conductivité (E) correspondante est mesurée après 2, 5, 10, 15, 20, 25, 35 et 60 minutes. A partir de cette cinétique, nous avons déterminé le temps optimal (maximum d'efflux). Les calculs de l'intégrité membranaire ont été réalisés à partir des valeurs enregistrées au bout de 35 mn (correspondant au temps optimal).

- Les disques du 2^e lot sont mis à bouillir dans le même volume d'eau distillée (20ml) pendant 5 minutes. Après refroidissement, la lecture de la conductivité correspondante à (ET) est également effectuée.

La conductivité du milieu d'imbibition (eau) correspond à la présence des ions (K⁺, etc...) libérés à partir des cellules. La valeur de cette conductivité est proportionnelle au degré de l'intégrité membranaire (E). Rapportée à la quantité totale d'ions présents dans la cellule (ET), elle représente une valeur relative correspondante à l'efflux d'ions.

L'intégrité membranaire est déterminée par le rapport entre la conductivité des disques foliaires mis dans l'eau non bouillie (E) à celle des disques mis à bouillir (ET).

$$\text{Efflux d'ions (\%)} = \frac{\text{E}}{\text{ET}} \times 100$$

3.2.3 -Analyses biochimiques

• Extraction et dosage des pigments foliaires

0.1g de matière végétale fraîche prélevée sur la 6^{ème} feuille sont broyés à froid dans 10 ml d'acétone à 80% et à faible éclaircissement.

Le broyat est centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tr.mn⁻¹. Le surnageant est récupéré et complété à 10 ml avec de l'acétone à 80 %.

L'absorbance des pigments est lue au spectrophotomètre (UV 1240 Shimadzu) après l'avoir étalonné aux différentes longueurs d'ondes à l'aide d'un blanc préparé à partir de 5 ml d'acétone à 80%.

$$\lambda_a = 647 \text{ nm et } \lambda_b = 663 \text{ nm pour les chlorophylles a et b.}$$

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

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

$$\text{Chl}_a = 12,25 \cdot \text{DO}(\lambda_b) - 2,79 \cdot \text{DO}(\lambda_a) \quad (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}).$$

$$\text{Chl}_b = 21,5 \cdot \text{DO}(\lambda_a) - 5,1 \cdot \text{DO}(\lambda_b) \quad (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}).$$

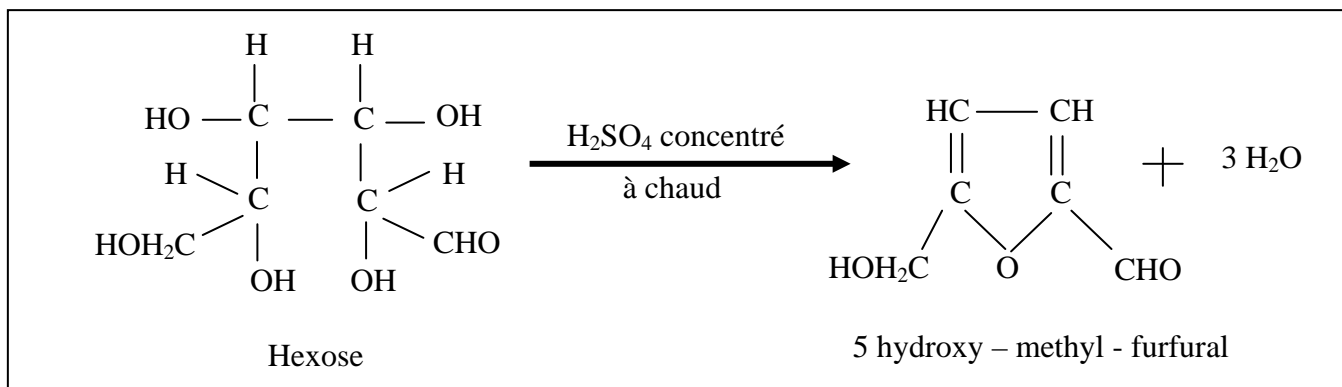
$$\text{Chl}_{a+b} = 7,15 \cdot \text{DO}(\lambda_b) + 18,71 \cdot \text{DO}(\lambda_a) \quad (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}).$$

$$\text{Caroténoïde} = \frac{1000\text{DO}(\lambda_c) - 1.82 \text{ Chl a} - 85.02 \text{ Chl b}}{198} \quad (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$$

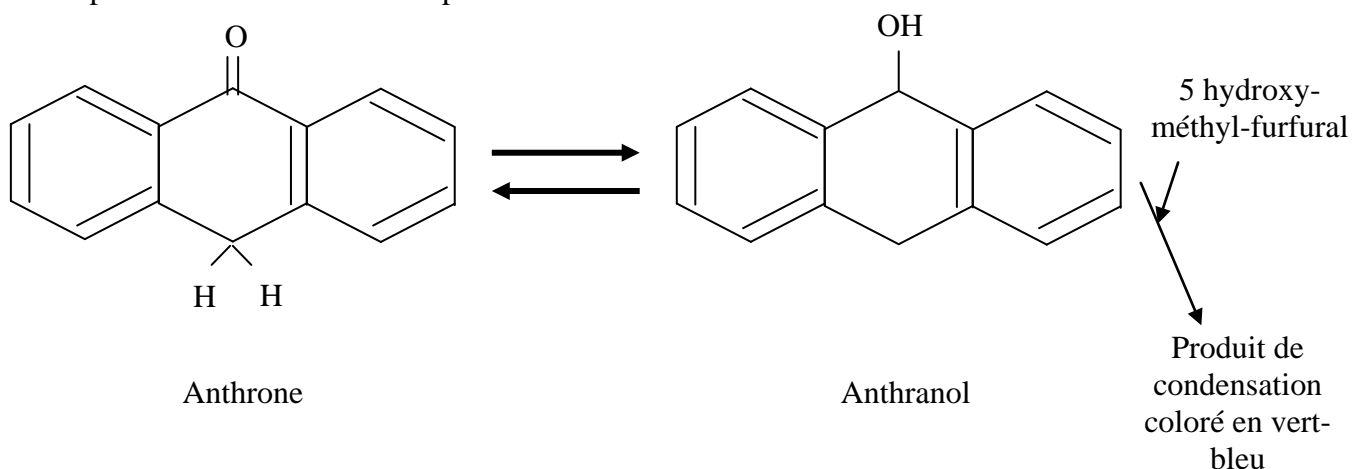
Les teneurs en pigments foliaires sont exprimées en mg/g de MVF. Le résultat est donné par la moyenne de 3 manipulations différentes.

• Extraction et dosage des sucres solubles

Les sucres solubles sont dosés selon la méthode de Mc Cready et *al.* (1950), qui consiste en la transformation à chaud et en milieu acide des oses en furfural et dérivés furfuriques (Cerning-Beroard, 1975).



L'anthrone en milieu acide se condense avec le furfural et ses dérivés pour donner des complexes colorés en vert-bleu pour les hexoses



1g de matière végétale fraîche provenant de la 4^{ème} feuille est broyé dans 10 ml d'éthanol bouillant à 80%. Après agitation au vortex, le broyât est centrifugé pendant 20 mn à 5000 tr.mn¹ ; le surnageant est récupéré dans une fiole de 50 ml. L'extraction est réalisée deux autres fois avec 5ml d'éthanol à 80 %, suivie d'une centrifugation pendant 15 mn à 3000 tr. mn⁻¹. Après chaque extraction, le surnageant est rajouté au précédent et le tout est ajusté à 50 ml par de l'eau distillée.

Le dosage est réalisé sur 0.5 ml de l'extrait glucidique auquel sont rajoutés 0.5 ml d'eau distillée et 2ml de réactif à l'anthrone. Après agitation au vortex, les tubes sont placés au bain Marie à 100° C pendant 7 minutes. Après refroidissement, les densités optiques sont lues à $\lambda = 630$ nm au spectrophotomètre UV-1240 Shimadzu.

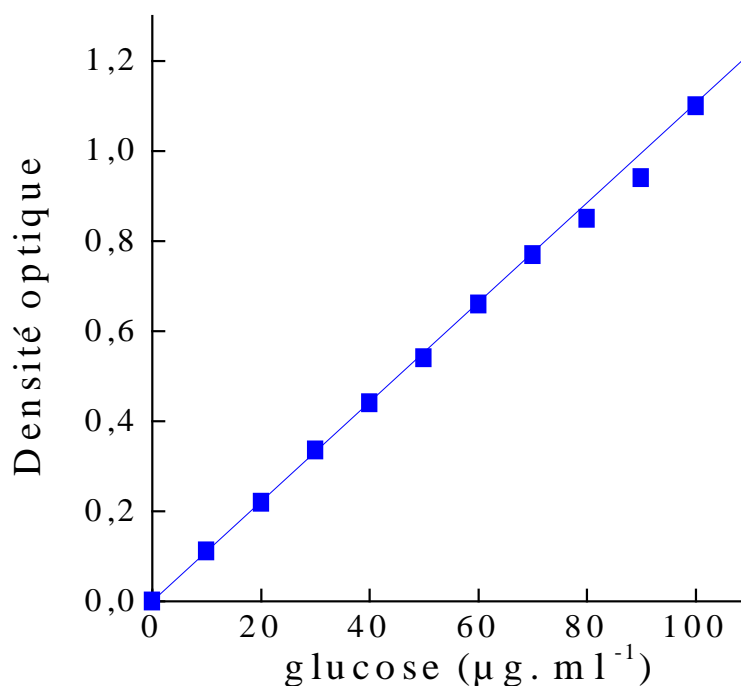


Figure 13 : Courbe étalon du glucose (sucre soluble).

La courbe étalon est réalisée à l'aide d'une solution mère de glucose à $200 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Les dilutions préparées varient de 0 à $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Les teneurs en sucres solubles sont exprimées en $\text{mg}.\text{g}^{-1}$ de MVF et représentent la moyenne de trois répétitions.

• Extraction et dosage de la proline

La proline est dosée selon la méthode de Troll et Lindsley (1955), modifiée par Bates et *al.* (1973). La proline réagit en milieu acide et à chaud avec la ninhydrine pour donner un composé rouge, soluble dans les solvants organiques tel que le benzène.

0.2 g de matière végétale sèche sont broyées à sec puis dans 10 ml de méthanol. Les flacons sont hermétiquement fermés et placés dans un bain-Marie à 80°C pendant 1 heure.

A 1 ml de l'extrait sont ajoutés 1 ml d'acide acétique et 1 ml de ninhydrine. Après agitation au vortex, les tubes sont placés dans un bain-Marie à 80°C pendant 30 minutes.

Après refroidissement des tubes, 5 ml de benzène sont rajoutés au mélange ainsi qu'une pincée de Na_2SO_4 afin d'éliminer l'eau qu'il renferme.

Après agitation au vortex, deux phases se développent après décantation:

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

La densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 515 nm au spectrophotomètre UV-1240 Shimadzu.

Une courbe étalon est réalisée ; elle est préparée à partir d'une solution mère de proline à 1 mM. Les teneurs en proline sont exprimées en $\text{mg}.\text{g}^{-1}$ de MVS et représentent la moyenne de 3 échantillons.

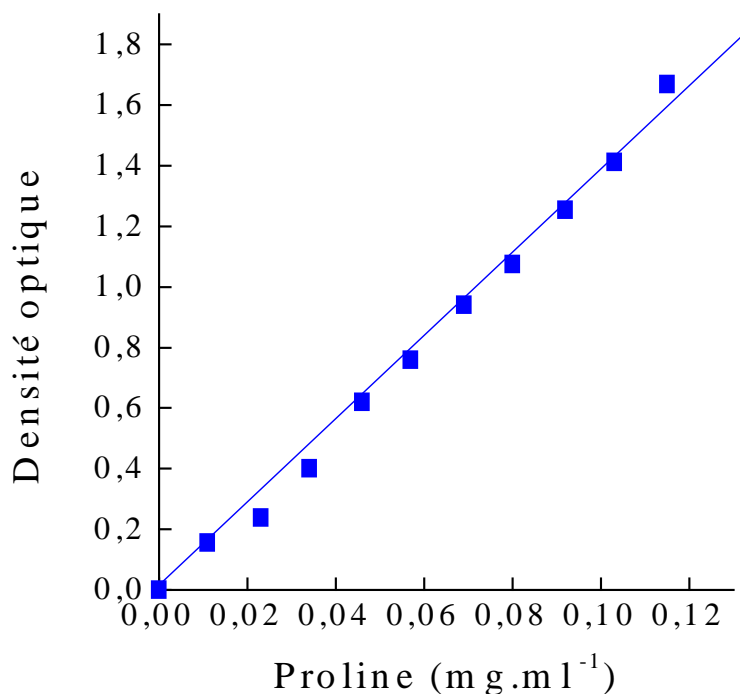


Figure14 : Courbe étalon de la proline.

• Extraction et dosage des protéines hydrosolubles

Les protéines hydrosolubles sont dosées selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode implique la formation d'un complexe de coloration bleue entre les protéines et le bleu de Coomassie (G250). La coloration bleue se développe rapidement et reste stable pendant 1 heure. Le complexe protéines-bleu de coomassie absorbe au maximum à une longueur d'onde de 595 nm.

L'extraction est réalisée sur 0.5 g de matière végétale fraîche (3^{ème} feuille) broyées dans 10 ml d'eau distillée. Le broyât est centrifugé pendant 15 mn à 5000 tr / mn. Le surnageant contenant les protéines hydrosolubles est récupéré.

A 1 ml de l'extrait protéique, sont rajoutés 5 ml de réactif de Biorad. Après quelques minutes d'incubation, les densités optiques sont lues à une longueur d'onde $\lambda = 595$ nm au spectrophotomètre UV-1240 Shimadzu.

La courbe étalon est réalisée à partir d'une solution mère de BSA à 1 mg. ml⁻¹. Les teneurs en protéines sont exprimées en mg.g⁻¹ de MVS et sont données par la moyenne de trois répétitions.

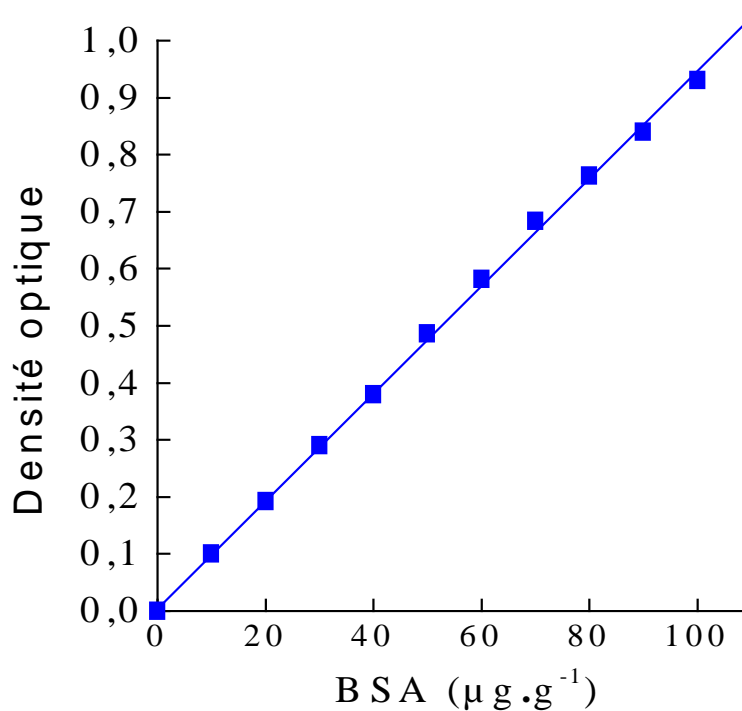


Figure 15 : Courbe étalon des protéines.

4 - Résultats et Discussion

4.1 - Statut hydrique

La teneur relative en eau des feuilles est un indice d'estimation de l'état hydrique des plantes ; elle varie selon l'espèce et l'intensité du stress.

4.1.1 - Evolution de la TRE au cours du dessèchement du substratum

L'évolution de l'humidité du substratum exprimée en pourcentage (Fig. 16B) est quasiment stable pour les témoins tout au long de l'expérimentation ; elle varie entre 81,7 et 77,9 %.

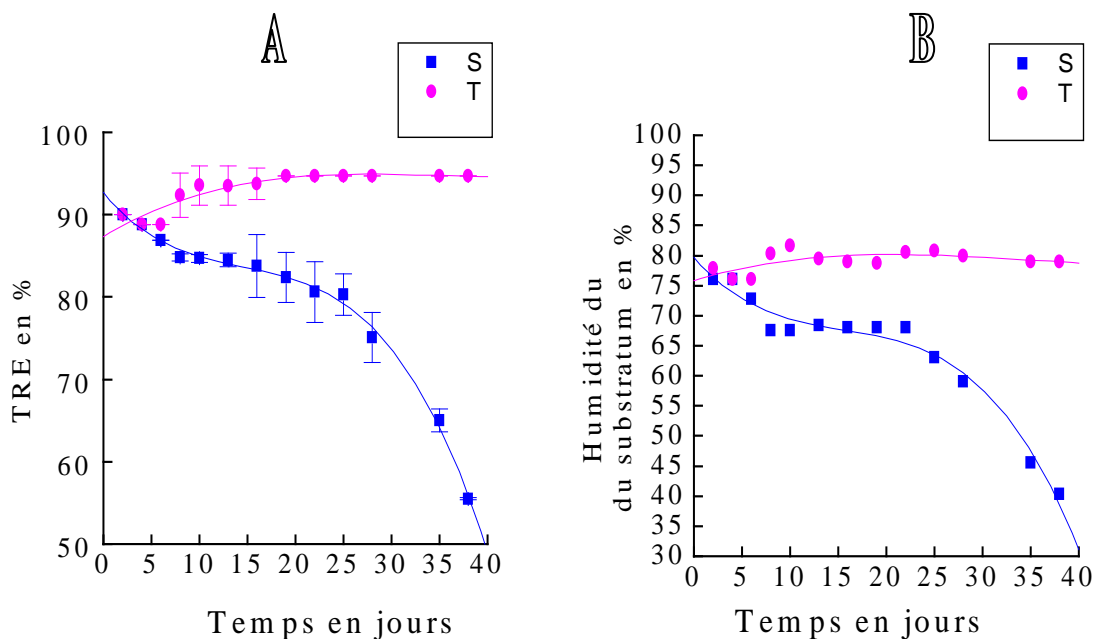


Figure 16 : Effet d'une contrainte hydrique sur l'évolution de la teneur relative en eau des feuilles de *Nicotiana sylvestris* (A) et sur l'humidité du substratum (B) avec et sans arrosage exprimée en pourcentage.

- Pour les pots non arrosés, la teneur en eau du substratum (Fig. 16B) suit la même cinétique que celle des témoins jusqu'au 22^{ème} jour mais avec des valeurs inférieures, soit une réduction d'environ 15 %. En effet, elle passe de 76 % au 1^{er} jour d'échantillonnage à 68 % au 22^{ème} jour après arrêt d'arrosage. Néanmoins, cette phase reste dans l'ensemble stable.

A partir du 22^{ème} jour, la teneur en eau diminue fortement jusqu'à atteindre 40 % au 38^{ème} jour d'arrêt d'arrosage, soit environ deux fois moins que celle des témoins (79 %) au même stade.

- L'évolution de la teneur relative en eau, mesurée en pourcentage, au niveau des feuilles des plantes témoins de *Nicotiana sylvestris* (Fig. 16A) reste stable tout au long de l'expérimentation, elle fluctue entre 90 et 94,7 %.

La teneur relative en eau des plantes stressées marque trois phases dans le temps :

- la première phase s'étale du 2^{ème} au 6^{ème} jour de l'échantillonnage ; la TRE est presque identique à celle des plantes témoins. En effet, elle passe de 90 à 86,9 %, soit une réduction de l'ordre de 2 % à chaque échantillonnage.

- A partir du 6^{ème} jour, la TRE diminue lentement d'environ 10 % par rapport aux plantes témoins, mais reste stable et ce jusqu'au 25^{ème} jour de stress (80,3 %).
- A partir du 25^{ème} jour, la TRE diminue fortement ; les variations enregistrées sont de l'ordre de 20 % au 28^{ème} jour, 30 % au 35^{ème} jour et 41 % au 38^{ème} jour. A ce stade final, la TRE atteint une valeur moyenne de 55,5 %, environ 2 fois moins que celle enregistrée chez les plantes témoins à la fin de l'expérimentation (94,7 %).

4.1.2 -Discussion

Jusqu'au 25^{ème} jour d'arrêt d'arrosage, les feuilles de *Nicotiana sylvestris* maintiennent une bonne balance hydrique, ceci est illustré par le fait qu'elles ne montrent pas une grande variation de leur TRE par rapport aux témoins. A ce niveau, la variation est d'environ 10 %.

Il est à signaler également que l'évolution de l'humidité dans le sol est strictement corrélée avec la TRE et suit la même cinétique d'évolution.

Selon (Pessaraki, 1999), le dessèchement du sol affecte l'approvisionnement en eau de la plante et serait responsable de la biosynthèse de l'acide abscissique (ABA) par les racines. Cette hormone véhiculée par la sève brute montant des racines jusqu'aux feuilles déclenche ainsi la fermeture des stomates, permettant aux plantes de tabac stressées de retenir ainsi le maximum d'eau.

Jusqu'à cette amplitude de stress, nos résultats coïncident avec ceux obtenus sur les feuilles de *Pisum sativum* (Nogues et al., 1998) qui maintient une TRE d'environ 70 % après 24 jours de déshydratation, d'*Olea europea* (Nogues et Baker, 2000) où la TRE ne diminue qu'après 4 semaines d'arrêt d'arrosage.

A partir du 25^{ème} jour (80,3 %), la TRE diminue brusquement pour atteindre 55,5 % au 38^{ème} jour de stress et elle est parallèle à la diminution de l'eau dans le sol (40 %).

La teneur en eau du sol diminue soit par évaporation à partir de la surface du sol ou parce qu'elle est absorbée par les racines. L'absorption de l'eau par les racines a lieu selon un gradient de potentiel hydrique entre le sol et les racines. Quand le sol s'assèche, son potentiel hydrique décline. De ce fait, les plantes trouvent des difficultés à extraire l'eau rapidement du sol pour équilibrer les pertes de l'eau par transpiration. La majorité des plantes sont incapables d'extraire une quantité significative d'eau quand le potentiel hydrique du sol chute au dessous de -1,5 Mpa (Hopkins, 1999). Sous ces conditions, les plantes pourraient montrer des signes de déficit hydrique, perdant ainsi leur turgescence.

Cette valeur de la TRE, enregistrée au 38^{ème} de l'application du stress, est atteinte beaucoup plus tôt chez certaines variétés d'espèces sensibles telles que *Lycopersicon esculentum* (après 12 jours de déshydratation) (Rey et al., 1998), *Solanum tuberosum* (au 12^{ème} de déshydratation) (Eymery et Rey, 1999 ; Broin et al., 2000), *Nicotiana tabacum* (après 10 jours de stress seulement) (Rey et al., 2000), *Zea mays* (au bout de 8 jours de stress) (Kim et al., 2000) et *Glycine max* (Cascardo et al., 2000).

Cette diminution de la TRE à ce niveau, suite à la déshydratation, est également notée chez certaines espèces résistantes notamment *Boea hygroskopica* au 12^{ème} jour de stress (Navari-Izzo et al., 2000), *Poa pratensis* L et *Festuca arundinacea* au 28^{ème} jour de déshydratation (Fu et Huang, 2001). De même, l'évolution de l'humidité dans le sol au cours de la déshydratation, corrélée avec la diminution de la TRE est en concordance avec les travaux réalisés sur *Pisum sativum* (Nogues et al., 1998) et sur certaines espèces méditerranéennes comme *Olea europea*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula stoechas* (Nogues et Baker, 2000).

Les feuilles de *Nicotiana sylvestris* sont, donc, capables de sauvegarder une quantité appréciable d'eau, ce qui montre une assez bonne adaptabilité de l'espèce, donc une bonne tolérance, due à une capacité de maintenir une turgescence des tissus à travers cette importante rétention d'eau. Contrairement à d'autres plantes, elle résiste pendant 25 jours.

Cet équilibre hydrique serait réalisé par, d'un côté, une faible évapotranspiration en régulant peut être le mouvement des stomates (Merah et al., 2001) et, d'un autre côté, par la mise en place d'un ajustement osmotique réalisé grâce à l'accumulation de solutés compatibles.

4.2 - Accumulation des osmolytes

Afin d'éviter ou de minimiser les conséquences néfastes de la contrainte hydrique sur la turgescence et, par conséquent, sur la croissance, certaines plantes vont devoir développer des mécanismes d'ajustement de leur pression osmotique pour pouvoir retenir l'eau convenablement. Cet ajustement osmotique est réalisé grâce à l'accumulation de composés organiques compatibles, de faible poids moléculaire, notamment la proline et les sucres solubles.

4.2.1 – Effet de la contrainte hydrique sur le taux de la proline libre

Jusqu'au 28^{ème} jour, la teneur en proline exprimée en mg.g^{-1} MVS (Fig. 17A) est relativement stable pour les feuilles de tabac témoins ; elle varie entre 3,33 et 3,83 mg.g^{-1} MVS. Ensuite, elle diminue pour atteindre 2.5 mg.g^{-1} MVS.

Dans les feuilles de tabac stressées, cette teneur augmente dès le 4^{ème} jour (3,48 mg.g^{-1} MVS), pour atteindre 6,33 mg.g^{-1} MVS au 13^{ème} jour de l'arrêt d'arrosage. De là, la teneur en proline dans les feuilles de plantes stressées augmente progressivement et d'une manière prononcée pour atteindre 14,25 mg.g^{-1} MVS au 38^{ème} jour de l'expérimentation ; elle est environ six fois plus élevée que la teneur enregistrée dans les feuilles de plantes témoins à la fin de l'expérimentation.

4.2.2 – Effet de la contrainte hydrique sur le taux des sucres solubles

La teneur en sucres solubles exprimée en mg.g^{-1} MVF (Fig. 17B) des feuilles de plantes stressées et témoins de *Nicotiana sylvestris* suit la même évolution jusqu'au 28^{ème} jour et avec des valeurs pratiquement similaires.

En effet, du 2^{ème} au 6^{ème} jour de l'expérimentation, la teneur en sucres solubles est stable dans les feuilles de plantes témoins ($1,92 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0,115$ MVF) et stressées ($1,73 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0,02$ MVF). Au delà, cette teneur continue à augmenter dans les deux lots jusqu'au 16^{ème} jour : elle passe de 1,92 mg.g^{-1} MVF à $3,64 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0,03$ MVF pour les plantes témoins et de 2,13 mg.g^{-1} MVF à $4,13 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0,13$ MVF chez les stressées, soit une variation moyenne d'environ 8 %.

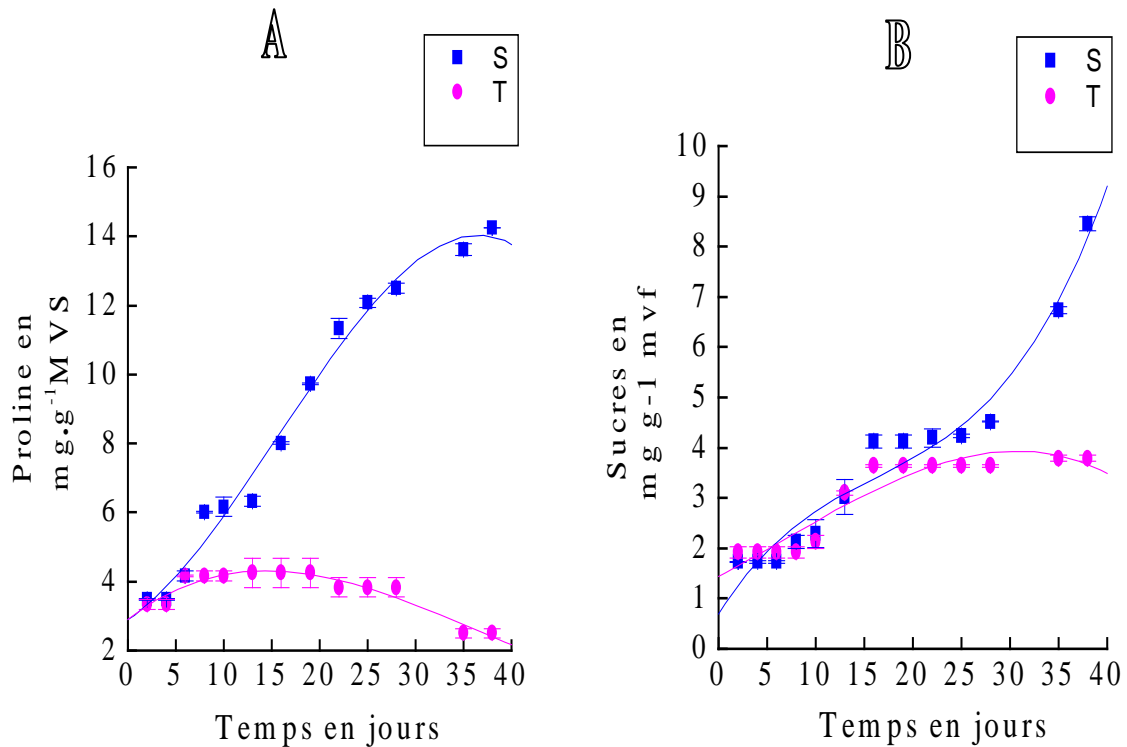


Figure 17 : Effet d'une contrainte hydrique sur la teneur en proline (mg.g^{-1} MVS) (A) et sur la teneur en sucres solubles (mg.g^{-1} MVF) (B) des feuilles de *Nicotiana sylvestris*.

A partir du 16^{ème} jour, la teneur en sucres solubles reste stable pour les plantes témoins ($3,7 \text{ mg.g}^{-1}$ MVF) jusqu'à la fin de l'expérimentation alors que pour les plantes stressées, la teneur en sucres solubles se stabilise jusqu'au 28^{ème} jour après arrêt d'arrosage ($4,25 \text{ mg.g}^{-1}$ MVF). Au-delà, cette teneur augmente très fortement et d'une manière très prononcée et brusque pour atteindre le double ($8,46 \text{ mg.g}^{-1}$ MVF) de celle enregistrée chez les plantes témoins ($3,79 \text{ mg.g}^{-1}$ MVF) au 38^{ème} jour de l'expérimentation.

4.2.3 - Discussion

- Les feuilles de tabac témoins montrent une diminution dans la teneur en proline à partir du 28^{ème} jour. En effet, il a été montré qu'en absence de stress et durant le développement normal des plantes, le niveau de la proline dépend de l'âge des feuilles. Dans les feuilles nouvellement formées, la teneur de la proline est plus importante que dans les feuilles adultes (Roosens et al., 1998). En effet, dans les jeunes plantules d'*Arabidopsis thaliana*, les deux voies glutamate et ornithine entraînent une accumulation de la proline (Roosens et al., 1998) alors que dans les plantules adultes, l'augmentation de la proline libre est principalement due à l'activité des enzymes de la voie glutamate, la voie de l'ornithine étant réprimée (Roosens et al., 1998).

Dans les feuilles de tabac stressées, l'accumulation de la proline commence à partir du 6^{ème} jour et s'accroît en fonction de l'intensité du stress. Elle atteint une teneur six fois plus importante que celle des plantes témoins.

L'accumulation de la proline suite à un déficit hydrique est le résultat de la stimulation des processus de biosynthèse de la proline et principalement par l'augmentation de l'expression de la Δ^1 pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS) (Hong et al., 2000) et de la répression des

processus de dégradation par l'inhibition de l'activité de la proline déshydrogénase (PDH) (Delauney et Verma, 1993 ; Peng *et al.*, 1996).

L'expression des gènes de biosynthèse et de dégradation de la proline sont sensibles au moindre changement dans le statut hydrique (Hayashi *et al.*, 2000).

La relation entre la synthèse de la proline et la tolérance à la déshydratation a été signalée dans les parties végétatives de *Phaseolus vulgaris* (Venekamp et Koot, 1988) qui, après deux jours, de déshydratation accumulent de 10 à 25 fois plus de proline et 85 % de cette accumulation est considérée être nouvellement synthétisée, dans les feuilles de plantes de *Saccharum sinensis* (Chen *et al.*, 1995), *Solanum tuberosum* (Büssis et Heineke, 1998), *Arabidopsis thaliana* (Nakashima *et al.*, 1998 ; Nambara *et al.*, 1998) où on détecte une forte expression du gène de biosynthèse de la proline après 10 h seulement de déshydratation. Par ailleurs, les plantules d'*Arabidopsis thaliana* mises à croître à faible humidité dans un milieu nutritif particulier, accumule un taux élevé de proline qui passe de 29 à 320 µg / g MVF (Yoshiba *et al.*, 1999).

L'accumulation de la proline suite à la déshydratation a été également montrée dans les feuilles de *Nicotiana tabacum* (Hong *et al.*, 2000) et *Solanum lacinatedum* (Alexieva, 2001) où la teneur en proline est multipliée par 12 fois suite à une déshydratation.

L'accumulation de la proline serait corrélée avec le potentiel hydrique (Navari-Izzo *et al.*, 1992) et serait liée à l'ajustement osmotique chez les espèces tolérantes à la déshydratation. Cet acide aminé peut s'accumuler chez les cultivars sensibles à la déshydratation et correspondre à un symptôme de stress (Clifford *et al.*, 1998) à l'exemple de *Phaseolus* (Andrade *et al.*, 1995) ou d'*Oryza sativa* (Iyer et Caplan, 1998). Dans ce cas, les fortes concentrations en proline seraient le résultat d'un déséquilibre dans d'autres voies métaboliques (Perez-Alfocea et Larher, 1995) et pourraient aider à protéger le métabolisme cellulaire et à faciliter le recouvrement après le stress.

L'accumulation de la proline libre au cours d'une déshydratation est toujours accompagnée par une augmentation dans la teneur en sucres solubles (Roitsch, 1999 ; Hellmann *et al.*, 2000).

- L'accumulation des sucres solubles dans les feuilles de *Nicotiana sylvestris* sous contrainte hydrique est liée à l'intensité du stress. En effet, à partir du 28^{ème} jour, cette accumulation devient plus prononcée, elle est deux fois plus importante que celle enregistrée dans les feuilles témoins.

La nature des sucres solubles accumulés au cours de la déshydratation dépend de l'espèce et de la régulation de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres.

Dans les conditions de déshydratation, l'accumulation du saccharose, corrélée avec l'activation de la SPS, est fréquente (Toroser et Huber, 1997 ; Winter et Huber, 2000). Ceci a été reporté dans les feuilles de *Phaseolus vulgaris* (Vassey et Sharkey, 1989; Castrillo, 1992) , *Spinacea oleracea*, *Lupinus albus*, *Oryza sativa* et *Eucalyptus globulus* (Garcia *et al.*, 1997) ainsi que dans les tubercules de *Solanum tuberosum* (Geigenberger *et al.*, 1997).

Chez *Craterostigma plantagineum*, une plante de résurrection, il a été montré que, suite à la déshydratation, la concentration du saccharose augmente jusqu'à représenter 90 % de la teneur totale des sucres (Kleines *et al.*, 1999) et 40 % du poids sec total (Ingram et Bartels, 1996). Cette accumulation du saccharose est corrélée avec l'augmentation dans l'expression d'au moins d'un des deux gènes de la saccharose phosphate synthétase (SPS) (Ingram *et al.*, 1997), du gène de la saccharose synthétase (SS) (Kleines *et al.*, 1999) ainsi que celle du gène de la glyceraldehyde-3-phosphate-deshydrogenase à NADP⁺ cytosolique (Velasco *et al.*, 1994). Cette dernière est à l'origine du glyceraldehyde-3P, précurseur du fructose 1,6 biphosphate indispensable à la synthèse du saccharose.

Certaines plantes soumises aux conditions de déshydratation sont caractérisées par une accumulation importante d'hexoses (glucose, fructose...) associée à une augmentation de

l'activité de l'invertase acide vacuolaire. Cette enzyme clive irréversiblement le saccharose en glucose et fructose (Pelleschi et *al.*, 1999) dans les tissus où l'activité de la saccharose phosphate synthetase est faible ou basse (Vanden Ende et Van Laere, 1995). C'est le cas notamment des feuilles *Phaseolus vulgaris* (Castrillo, 1992), *Saccharum sp* (Du et *al.*, 1998), *Zizyphus mauritiana* (Lamk) (Clifford et *al.*, 1998) et de feuilles matures de *Zea mays* (Kim et *al.*, 2000).

En effet, la répression de l'activité de l'invertase acide par un ARN antisens augmente la teneur en saccharose dans les fruits de *Lycopersicon esculentum* (Klann et *al.*, 1996) et réduit l'accumulation des hexoses dans les tubercules de *Solanum tuberosum* (Zrenner et *al.*, 1996). Avec l'intensification de la contrainte hydrique, l'accumulation des sucres solubles devient plus importante. Elle peut être renforcée par un ralentissement de leur utilisation par les différents organes utilisateurs dont la croissance est ralentie par la déshydratation (Ferrario et *al.*, 1998 ; Kim et *al.*, 2000) et / ou par une accélération de la dégradation de l'amidon par stimulation de l'activité amylolytique (Müller et *al.*, 1997).

L'accumulation de proline apparaît comme étant la première manifestation de l'application d'une contrainte hydrique chez *Nicotiana sylvestris*, son accumulation dans le temps est plus accentuée avec la diminution de la TRE. A l'opposé, les sucres solubles ne commencent à s'accumuler qu'à faible TRE.

Ces deux osmolytes interviennent dans l'ajustement osmotique (Clifford et *al.*, 1998), maintiennent la structure des membranes (Hare et *al.*, 1998), stabilisent les DNA et minimisent les effets néfastes des radicaux libres produits au cours de la déshydratation (Clifford et *al.*, 1998).

Cette capacité à accumuler de la proline a été utilisée comme base pour la sélection de nombreuses génotypes tolérants à la déshydratation (Van Heerden et De Villier, 1996). La signification de l'accumulation des osmotica, et potentiellement de la proline, n'est pas tout à fait tranchée. Si le lien entre leur apparition et le stress est prouvé, certains auteurs pensent qu'il s'agit d'une indication de sensibilité alors que d'autres affirment qu'il s'agit d'un signe de résistance (Rascio, 1988).

Par ailleurs, plusieurs auteurs (Hubac et Vieira Da Silva, 1980), Belarbi et Monneveux (1988) ont constaté que les génotypes qui ont une meilleure aptitude à conserver une teneur en eau assez élevée, sont ceux qui accumulent plus de sucres solubles et permettent, ainsi, le maintien du végétal en vie plus longtemps.

En aidant à maintenir la turgescence foliaire, l'ajustement osmotique permet aux plantes de garder leurs stomates ouverts et continuer, ainsi, à absorber le CO₂ pour la réalisation de la photosynthèse (Hopkins, 1999), de même qu'il favorise l'élongation cellulaire grâce à une modification de l'élasticité de la paroi cellulaire (Clifford et *al.*, 1998).

4.3 - Répercussion de la contrainte hydrique sur la croissance de la plante

Afin d'étudier l'effet de la contrainte hydrique sur la croissance du végétal, nous avons procédé au suivi de l'évolution du poids de la matière végétale sèche des parties aériennes et racinaires des plantes stressées et témoins. Nous nous sommes également intéressés au rapport partie aérienne / racine.

4.3.1 -Evolution du poids de la partie aérienne

Le poids de la matière végétale sèche (PMVS) de la partie aérienne des plantes de tabac témoins (Fig. 18) augmente jusqu'au 10^{ème} jour. En effet, il passe de 0,9 à 1,6 g MVS. De là, il se stabilise jusqu'à la fin de l'expérimentation autour de 1,6 g MVS.

L'évolution du poids de la partie aérienne des plantes stressées (Fig. 18) est similaire à celle des plantes témoins au cours de la première phase qui s'étale jusqu'au 19^{ème} jour, mais à des valeurs légèrement supérieures d'environ 9 %. En effet, le poids passe de 0,7 à 1,7 g MVS. De là, il diminue progressivement pour atteindre 0,5 g MVS à la fin de l'expérimentation, soit une diminution d'environ 50 % par rapport aux plantes témoins.

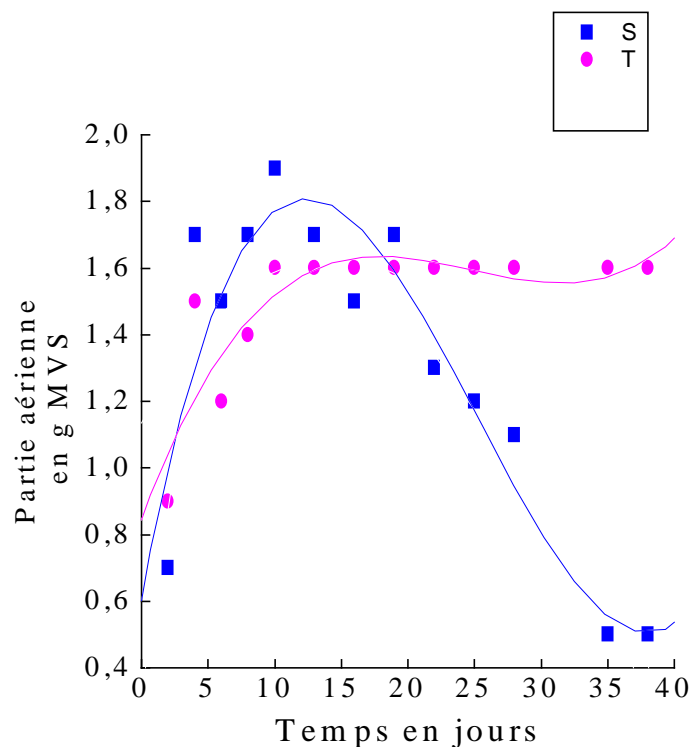


Figure 18 : Evolution du poids (g MVS) de la partie aérienne des plantes de *Nicotiana sylvestris* stressées et témoins au cours d'une contrainte hydrique.

4.3.2 -Evolution du poids du système racinaire

Pour les plantes témoins, l'évolution du poids des racines (Fig. 19) exprimé en g MVS augmente dans le temps jusqu'au 16^{ème} jour où la valeur atteinte est de 0,5. Ensuite, elle reste quasiment stable tout au long de l'expérimentation.

Pour les racines des plantes stressées (Fig. 19), leur poids augmente progressivement avec des valeurs importantes par rapport aux plantes témoins jusqu'au 25^{ème} jour. En effet, le poids passe de 0,2 à 0,9 g MVS, soit une augmentation d'environ deux fois plus par rapport aux plantes témoins. De là, il se stabilise jusqu'à la fin de l'expérimentation.

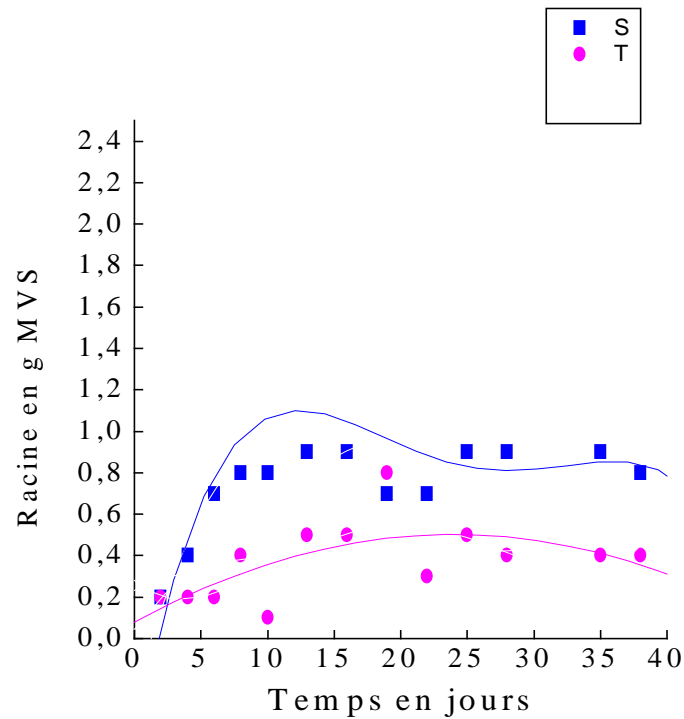


Figure 19 : Evolution du poids des racines (g MVS) des plantes stressées et témoins de *Nicotiana sylvestris* au cours d'une contrainte hydrique.

4.3.3 - Le rapport pondéral Partie Aérienne / Racine

Afin d'étudier l'effet du stress sur le développement du végétal dans son ensemble et vu l'hétérogénéité pondérale des plantes, nous avons tracé des courbes de tendance du rapport partie aérienne / racine qui renseignent bien sur l'évolution des valeurs de ce rapport en fonction du temps.

En effet, pour les témoins, la valeur moyenne des rapports reste stable entre 10 et 11, alors que pour les plantes stressées, les valeurs diminuent progressivement pour passer d'environ 10 au premier jour de l'échantillonnage à 3 au 38^{ème} jour.

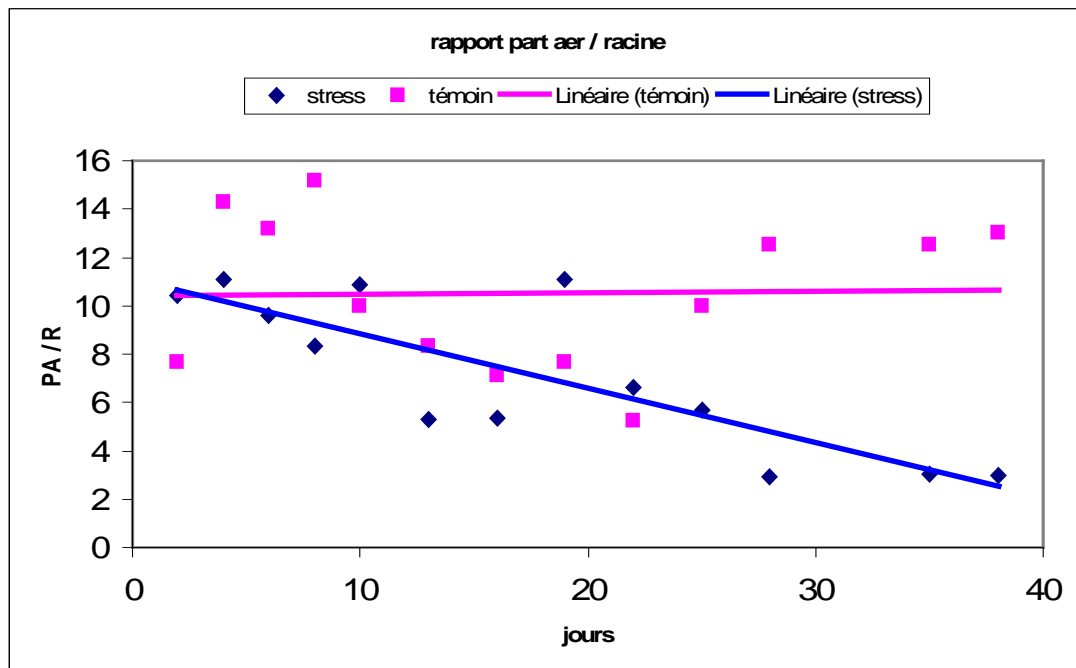


Figure 20 : Evolution du rapport pondéral partie aérienne / racine au cours de la déshydratation des plantes stressées et témoins de *Nicotiana sylvestris*.

4.3.4 - Discussion

Traditionnellement, l'effet d'un faible potentiel hydrique sur la croissance cellulaire était attribué à une perte de la turgescence des cellules de la zone de croissance, lequel en retour réduit l'expansion foliaire. Cependant, il a été démontré que la turgescence n'est pas le seul facteur contrôlant la croissance cellulaire en conditions de stress (Hopkins, 1999).

Westgate et Boyer (1985) mettent en cause le gradient de potentiel hydrique entre le xylème et la feuille. En effet, il a été montré que l'augmentation du potentiel hydrique de la sève brute est un signal qui ferme les stomates dans les feuilles des plantes quand le sol est déshydraté (Wilkinson et al., 1998).

L'altération du statut hydrique de la plante entière est accompagnée d'une modification de sa croissance qui dépendra de l'organe considéré ainsi que de l'intensité du stress.

Jusqu'au 19^{ème} jour, l'évolution du poids de la partie aérienne des plantes de tabac stressées est identique à celle des témoins mais à des valeurs plus importantes alors que les racines continuent à croître jusqu'au 25^{ème} jour toujours avec des valeurs supérieures à celles des témoins.

La diminution de la teneur en eau, corrélée avec celle du sol semble agir sur la croissance de la plante. De ce fait, les plantes de tabac stressées répondent à ces conditions d'arrêt d'arrosage par une stabilisation du développement du système racinaire et une réduction importante de la partie aérienne.

Initialement, l'humidité du sol est suffisante pour maintenir une balance hydrique permettant aux plantes de croître. Néanmoins, nous remarquons que, dès le début, la croissance des racines est importante par rapport aux parties aériennes.

La croissance de la partie aérienne et particulièrement celle des feuilles est plus sensible à la déshydratation que la croissance des racines (Hopkins, 1999).

Le changement dans le rapport partie aérienne / racine signifie que la grande proportion des assimilats de la plante sont distribués au système racinaire d'où sa croissance importante (Zeiger, 1998). Il y a donc une faible disponibilité de produits qui vont migrer vers les parties aériennes, ce qui ne leur assure pas une croissance convenable.

La diminution du rapport partie aérienne / racine quand les provisions en eau du sol sont limitées est un avantage car elle améliore la capacité du système racinaire à extraire plus d'eau par l'exploration d'un volume plus important du sol (Hopkins, 1999) pour le maintien des fonctions vitales dans toute la plante en attendant la levée du stress.

Les restrictions dans les parties aériennes et particulièrement une diminution dans l'expansion foliaire est bénéfique pour le végétal sous les conditions de déshydratation, ceci conduit à une surface foliaire plus petite et donc une transpiration plus faible (Hopkins, 1999)..

Plus récemment, il a été montré que la croissance des tiges et feuilles peut être inhibée à faible potentiel hydrique malgré le maintien de la turgescence dû à un ajustement osmotique (Kirnak et al., 2001). Ceci a été montré chez le fraisier (Kirnak et al., 2001) et *Solanum melongena* (Kirnak et al., 2001) où les racines continuent à croître à faible potentiel hydrique du sol qui inhibe complètement la croissance de la partie aérienne ; il en résulte un faible rapport partie aérienne / racine.

Chez *Zea mays* (Westgate et Boyer, 1985), les racines continuent également à croître à un potentiel hydrique des tissus qui provoque l'inhibition complète de la croissance de la partie aérienne. En effet, l'expansion foliaire présente une diminution significative lorsque le potentiel hydrique foliaire atteint -0,45 MPa alors que la croissance est complètement inhibée à -1 MPa. Parallèlement, une croissance normale de la racine est maintenue jusqu'à ce que le potentiel hydrique des tissus racinaires atteigne -0,85 MPa et cette croissance n'est complètement inhibée qu'à -1 MPa.

Ce type de comportement a également été observé chez la tomate (Perez-Alfonsea et al., 1993) et le maïs (Pelleshi et al., 1997) en situation de déficit en eau.

Par ailleurs, Pessaraki (1999) a noté que la déshydratation du sol induit un signal qui pourrait entraîner la biosynthèse par les racines de l'acide abscissique (ABA). Apparemment, l'accumulation de l'acide abscissique pourrait entraîner une inhibition de la croissance des parties aériennes et stimuler l'augmentation de la croissance des racines (Cornic et Massaci, 1996).

La diminution dans la croissance des plantes suite à la déshydratation a été également rapportée chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana*, *Triticum durum* (Navari-Izzo et al., 1993), *Oryza sativa*, *Zea mays* et *Hordeum vulgare* (Lu et Newmann, 1999), *Olea europaea*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula stoechas* (Nogues et Baker, 2000), *Pisum sativum* et *Triticum aestivum* (Alexieva et al., 2001).

4.4 – Effet de la contrainte hydrique sur l'intégrité membranaire

Jusqu'au 13^{ème} jour, l'évolution dans le temps de l'indice d'intégrité membranaire (**IIM**), mesuré en termes d'efflux d'ions, au niveau des feuilles de *Nicotiana glauca* stressées et témoins est identique et stable. Il est de 13,4 % pour les stressées et pour les témoins.

A partir du 13^{ème} jour, l'IIM reste constant et stable pour les plantes témoins (13,4 %) jusqu'à la fin de l'expérimentation.

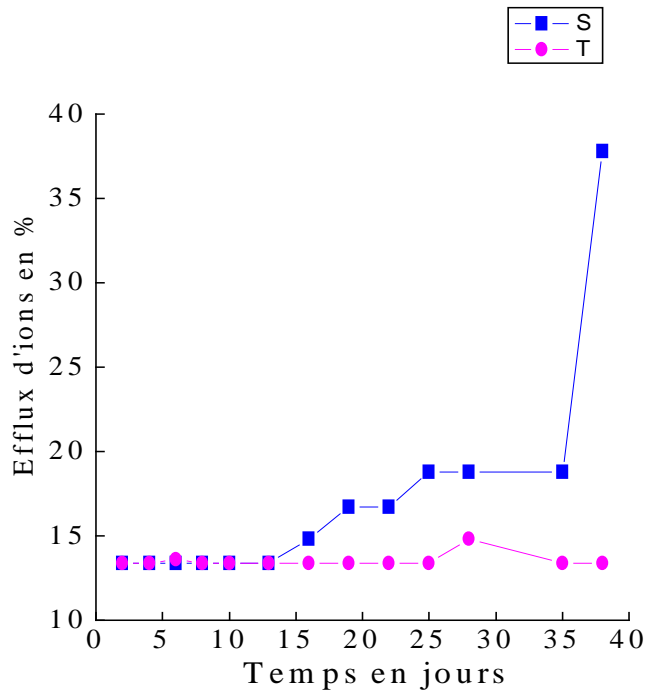


Figure 21 : Effet d'une contrainte hydrique sur l'efflux d'ions en (%) dans les feuilles de *Nicotiana sylvestris*.

Pour les plantes stressées, cette première phase est suivie par une deuxième qui s'étale jusqu'au 28^{ème} jour, où l'on observe une légère augmentation de l'indice d'intégrité membranaire (IIM) qui passe de 13,4 % à 18,8 % au 35^{ème} jour d'arrêt d'arrosage.

A partir du 35^{ème} jour, l'IIM augmente subitement (troisième phase) pour atteindre 37,7 % au 38^{ème} jour de stress, environ 3 fois supérieur à celui enregistré chez les témoins au même stade.

4.4.1 - Discussion

L'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes biologiques nécessite la présence d'eau. Tout changement de la balance hydrique de la plante entraînerait des variations dans la stabilité des membranes avec des implications sur la perméabilité et des interactions entre les lipides et les protéines (Epan, 1998). Le maintien de la structure fluide fonctionnelle de la membrane dépend du degré du stress et la capacité du végétal à lui faire face.

L'absence de l'eau mène à un entassement de phospholipides, conduisant à un changement de phases des lipides qui passent de la phase liquide-cristalline à la phase gel (Hoekstra et al., 2001), provoquant une augmentation significative de la perméabilité cellulaire aux ions et aux solutés (Trémolière et al., 1989 ; Navarri-Izzo et al., 1993).

Chez *Nicotiana sylvestris*, la perte de l'intégrité membranaire mesurée en terme d'efflux d'ions commence à partir du 13^{ème} jour. Elle est plus importante à partir du 35^{ème} jour après arrêt d'arrosage, ce qui coïncide avec la réduction significative dans la teneur en eau de la plante ainsi que celle du sol.

Initialement, l'intensité du stress n'étant pas importante, les cellules sont pleinement hydratées et la configuration de l'ensemble des lipides membranaires en phase liquide cristalline est maintenue, lui assurant une fluidité et un fonctionnement optimum.

En plus de la capacité du végétal à restructurer l'ensemble des lipides membranaires, la présence de solutés compatibles (proline ou sucres solubles) peut également garder la surface de la membrane hydratée et empêcher ainsi sa rigidification.

Avec une diminution plus importante de l'eau, les solutés compatibles et plus spécialement les sucres (Hoekstra et *al.*, 2001) remplacent les molécules d'eau disparues et établissent des liaisons directes avec la surface des membranes. Ce lien direct assure le maintien de l'espace entre les molécules des phospholipides et permet de sauvegarder la phase liquide cristalline de la bicouche et empêchent ainsi sa rigidification.

L'intensification du stress, malgré l'accumulation d'osmolytes enregistrée, mène à une perte de l'intégrité membranaire. El Haffid (1986) et Adjahosson (1983) ont montré que la modification de l'activité de certaines enzymes est à l'origine de l'effet du stress hydrique sur la membrane. En effet, l'intensité importante de la contrainte hydrique entraînerait une diminution importante du degré d'insaturation des acides gras des lipides polaires (à la fois par destruction des acides gras polyinsaturés et par arrêt de leur biosynthèse) et une accélération de la dégradation des lipides polaires par les phospholipases et les galactolipases (Liljenberg et Kates, 1984 ; El Haffid et *al.*, 1994). La dégradation des phospholipides induit une destruction de la membrane d'où cette augmentation remarquable de l'efflux d'ions.

L'augmentation de l'efflux d'ions suite à la déshydratation a été signalée dans les feuilles de *Gossypium hirsutum* (D'Aoust et Hubac, 1986), *Pennisetum americanum* L (Dassa-Girard, 1987) *Triticum durum* (Navari-Izzo et *al.*, 1993), *Avena sterilis* (Maldonado et *al.*, 1997), *Jatropha curcas* (Ouedraogo, 2000), *Pisum sativum* et *Triticum durum* (Alexieva et *al.*, 2001).

Des études menées sur *Lupinus albus* (Trémolières et *al.*, 1989) ont montré que l'efflux d'ions qui accompagne un stress hydrique concerne surtout les ions K^+ et Ca^{2+} . Dans les coléoptiles d'*Avena sterilis* (Rubeinstein, 1982), osmotiquement stressées au mannitol, l'efflux d'ions implique aussi bien les ions K^+ et H^+ ainsi que l'acide α -amino butyrique. Dans les cultures d'*Arabidopsis thaliana* (Curti et *al.*, 1993) et dans le mesophylle foliaire de *Phaseolus vulgaris* (Shabala et *al.*, 2000), le même traitement (au mannitol) induit un efflux de protons H^+ seulement.

Certains auteurs ont lié l'augmentation de l'efflux d'ions à la réduction de l'absorption de l'eau par la plante, c'est le cas notamment du sorgho (Premachandra et *al.*, 1992) et de certaines espèces de fragaria (Mc Donald et Archbold, 1998). D'autres l'ont lié à la diminution de la teneur en chlorophylles des feuilles due à leurs sénescence, comme c'est le cas des feuilles d'*Oryza sativa* (Chen et *al.*, 1991) et du fraisier (Kirnak et *al.*, 2001). D'autres ont lié la perte de l'intégrité membranaire aux effets combinés des deux phénomènes, comme c'est le cas de *Solanum melongena* (Kirnak, 2001).

4.5 – Effet de la contrainte hydrique sur le taux des protéines hydrosolubles

Jusqu'au 6^{ème} jour, les teneurs en protéines hydrosolubles (exprimées en $mg.g^{-1}$ MVS) évoluent de la même manière pour les plantes témoins et les stressées.

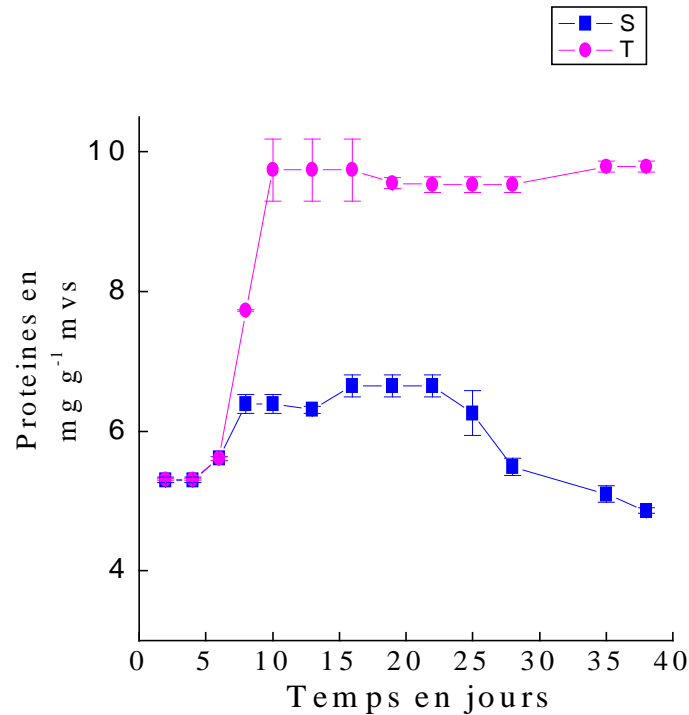


Figure 22 : Effet d'une contrainte hydrique sur la teneur en protéines solubles (mg.g^{-1} MVS) de *Nicotiana glauca*.

En effet, la teneur en protéines hydrosolubles passe de $5,31 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$ MVS à $5,61 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$ MVS pour les plantes de tabac témoins et de $5,3 \pm 0,04 \text{ mg.g}^{-1}$ MVS à $5,61 \pm 0,03 \text{ mg.g}^{-1}$ MVS pour les plantes de tabac stressées.

Chez les plantes de tabac témoins, les teneurs en protéines hydrosolubles continuent à augmenter dans le temps pour atteindre ($9,79 \text{ mg.g}^{-1}$ MVS) à la fin de l'expérimentation alors que chez les plantes de tabac stressées, la première phase allant du 2^{ème} au 6^{ème} jour est suivie d'une deuxième phase qui va du 6^{ème} au 22^{ème} jour ($6,65 \text{ mg.g}^{-1}$ MVS) après arrêt d'arrosage où les teneurs en protéines hydrosolubles augmentent, mais, à des valeurs inférieures d'environ 30 % par rapport aux plantes témoins. Néanmoins, cette phase est marquée par une certaine stabilité dans le temps. A partir du 22^{ème} jour, les teneurs en protéines diminuent progressivement pour atteindre $4,86 \text{ mg.g}^{-1}$ MVS, environ deux fois moins que celle enregistrée chez les plantes témoins au 38^{ème} jour de l'expérimentation.

4.5.1- Discussion

L'effet d'une contrainte hydrique sur le métabolisme protéique varie selon l'intensité du stress. Un déficit hydrique intense provoque de grandes perturbations au niveau de systèmes enzymatiques intervenant dans la protéogénèse (Calmes et al., 1985).

Jusqu'au 6^{ème} jour, le déficit hydrique ne s'est pas manifesté, les plantes stressées présentent un taux de protéines presque identique à celui des plantes témoins.

A partir du 6^{ème} jour, une légère diminution de la TRE, entraîne une réduction d'environ 30 % de la synthèse protéique par rapport aux plantes témoins. Cette phase reste tout de même stable jusqu'au 22^{ème} jour.

Lawlor et Cornic (2002) ont noté que, suite à un stress de faible intensité, les teneurs en acides aminés diminuent et sont destinées pour la synthèse des protéines solubles et le maintien de la croissance (Lawlor et Cornic, 2002).

Le ralentissement de la synthèse protéique par rapport aux plantes témoins peut être lié à l'expression ou à la répression de certains gènes qui sont sous le contrôle de l'ABA (Bray, 1993), provoquant ainsi des perturbations au niveau des systèmes enzymatiques intervenant dans la protéogénèse (Calmes et al., 1985) et conduisant le plus souvent à la diminution dans la teneur en protéines (Zuily-Fodil, 1990). Il peut être aussi expliqué par le non assemblage des acides aminés qui serait dû à la défaillance des polyribosomes (Bradford et Hsiao, 1982) liée à l'altération des ARNm. Ceci entraînera, par conséquent, la réduction de la formation des chaînes polypeptidiques (Handa et al., 1983) comme il a été observé dans les feuilles de tomate (Ho et Mishkind, 1991).

La réduction du taux de protéines par rapport aux plantes témoins peut être liée également, à une certaine activation des protéases. La dualité activation-inhibition des protéases peut être expliquée par l'hypothèse de régulation par un effet feed-back, c'est à dire que le produit de l'hydrolyse module, par son taux, l'activité enzymatique. En effet, suite à l'activation des protéases, les hydrolysats (acides aminés et peptides) augmentent et s'accumulent et le taux de protéines diminue, ce qui va provoquer par la suite l'inhibition des protéases, ainsi l'hydrolyse des protéines est ralentie.

Quand l'intensité du stress est importante, la dégradation et l'inhibition de la synthèse des protéines ont lieu simultanément (Deleu et al., 1999 ; Lawlor et Conic, 2002).

A ce stade, la déshydratation induit une forte activité des protéases qui accélère le turnover des protéines (Diaz et al., 1993 ; Ingram et Bartels, 1996). Ainsi la sénescence des plantes est accélérée avec comme conséquence l'hydrolyse des protéines et donc une accumulation d'acides aminés.

La diminution de la teneur en protéines suite à un déficit hydrique a été notée chez différentes espèces telles que *Pisum sativum* (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998) chez lequel un déficit hydrique modéré entraîne une diminution de 7,3 % alors qu'un stress hydrique sévère entraîne une chute des protéines de 23 % . Chez *Triticum aestivum* (Zagdanska et Wisniewski, 1998), la teneur en protéines solubles est réduite de moitié dans les feuilles matures alors que chez *Boea hygroskopica* (Navari-Izzo et al., 2000), la teneur en protéines diminue de 30 % après 7 jours de déshydratation.

Il a été montré que dans les étapes avancées de la déshydratation, le niveau d'acides aminés total peut augmenter à cause de la protéolyse et de la perturbation dans la translocation des acides aminés vers les racines (Larsson, 1992).

4.6 - Les pigments photosynthétiques

4.6.1 – Effet de la contrainte hydrique sur le taux des chlorophylles

- Jusqu'au 28^{ème} jour d'arrêt d'arrosage, la teneur en chlorophylle *a* (Fig. 23 A) exprimée en mg.g⁻¹ MVF suit la même évolution pour les plantes témoins et stressées à un niveau inférieur d'environ 30 % par rapport aux témoins. La teneur en chlorophylle *a* enregistrée à ce niveau est de (0,98 mg.g⁻¹ MVF) pour les plantes témoins et de (0,71 mg.g⁻¹ MVF) pour les plantes stressées

A partir du 28^{ème} jour, la teneur en chl *a* augmente pour les plantes témoins (1,105 mg.g⁻¹ MVF) alors que pour les plantes stressées, elle chute légèrement au début, puis brusquement, pour atteindre 0,446 mg.g⁻¹ MVF, soit environ deux fois moins (-59, 6 %) comparativement aux témoins.

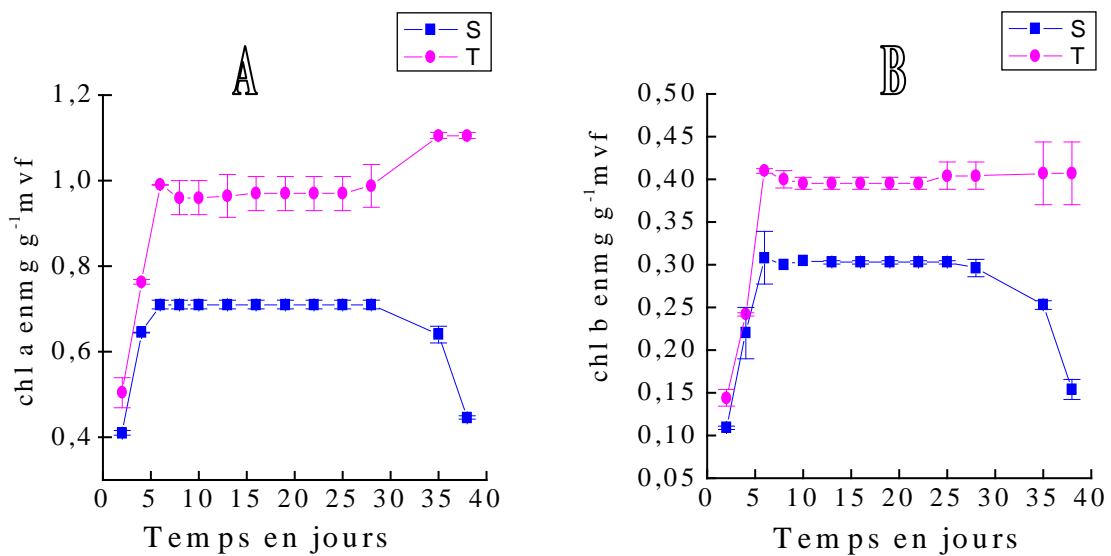


Figure 23 : Effet d'une contrainte hydrique sur la teneur en chl *a* (A) et chl *b* (mg.g⁻¹ MVF) (B) des feuilles de *Nicotiana sylvestris*.

- L'évolution de la teneur en chlorophylle *b*, exprimée en mg.g⁻¹ MVF (Fig. 23B), est similaire pour les témoins et stressées et ce jusqu'au 28^{ème} jour de l'arrêt d'arrosage à une différence moyenne d'environ 25 % par rapport aux plantes témoins. A ce stade, la teneur en chlorophylle *b* est de (0,40 mg.g⁻¹ MVF) pour les plantes témoins et de (0,296 mg.g⁻¹ MVF) pour les plantes stressées.

A partir du 28^{ème} jour, la teneur en chlorophylle *b* continue à rester stable pour les plantes témoins jusqu'à la fin de l'expérimentation alors qu'elle chute légèrement au début, puis brusquement, pour les plantes stressées. Dans ce dernier cas, elle atteint 0,154 mg.g⁻¹ MVF, ce qui représente la moitié de la teneur enregistrée chez les témoins.

- Jusqu'au 38^{ème} jour de l'expérimentation, l'évolution du rapport chl *a* / chl *b* est dans l'ensemble constante et stable dans les feuilles des plantes de *Nicotiana sylvestris* témoins et stressées mais à des valeurs inférieures par rapport aux plantes témoins.

Du 2^{ème} au 6^{ème} jour, le rapport chl *a* / chl *b* diminue pour les plantes stressées et témoins : il passe de 3,60 à 2,40 pour les plantes témoins et de 3,85 à 2,45 pour les stressées, soit une réduction d'environ 4 % par rapport aux stressées. A partir du 6^{ème} jour, le rapport se stabilise pour les deux lots. En effet, le rapport moyen des plantes témoins est de 2,48, celui des plantes stressées est de 2,36. Au 38^{ème} jour, le rapport des plantes stressées marque une diminution d'environ 4 % par rapport aux plantes témoins, mais reste constant.

Tableau I : Effet d'une contrainte hydrique sur l'évolution du rapport chl *a* / chl *b* dans les feuilles de *Nicotiana sylvestris*.

| Jours | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 13 | 16 | 19 | 22 | 25 | 28 | 35 | 38 |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Chl <i>a</i> / <i>b</i> témoins | 3,60 ± 0,23 | 3,15 ± 0,01 | 2,40 ± 0,01 | 2,44 ± 0,09 | 2,53 ± 0,04 | 2,53 ± 0,04 | 2,45 ± 0,07 | 2,45 ± 0,07 | 2,45 ± 0,07 | 2,45 ± 0,07 | 2,46 ± 0,13 | 2,52 ± 0,08 | 2,52 ± 0,08 |
| Chl <i>a</i> / <i>b</i> stressés | 3,85 ± 0,05 | 3,220 ± 0,006 | 2,45 ± 0,05 | 2,37 ± 0,05 | 2,33 ± 0,05 | 2,35 ± 0,05 | 2,35 ± 0,06 | 2,35 ± 0,06 | 2,35 ± 0,06 | 2,35 ± 0,06 | 2,35 ± 0,08 | 2,43 ± 0,01 | 2,38 ± 0,19 |

4.6.2 – Effet de la contrainte hydrique sur le taux de caroténoïdes

Jusqu'au 25^{ème} jour, la teneur en caroténoïdes suit la même évolution pour les deux lots mais avec des amplitudes différentes. A ce stade, elle est de 0,221 mg.g⁻¹ MVF pour les plantes stressées et de 0,32 mg.g⁻¹ MVF pour les plantes témoins, soit une variation d'environ 30 %. A partir du 25^{ème} jour après arrêt d'arrosage, cette quantité reste stable jusqu'à la fin de l'expérimentation pour les feuilles de plantes témoins (0,32 mg.g⁻¹ MVF) alors que pour les stressées, elle commence à diminuer régulièrement jusqu'au 35^{ème} jour (0,188 mg.g⁻¹ MVF) à partir duquel elle subit une chute brutale pour atteindre 0,13 mg.g⁻¹ MVF, environ 3 fois moindre (-60 %) comparativement aux témoins au 38^{ème} jour après arrêt d'arrosage.

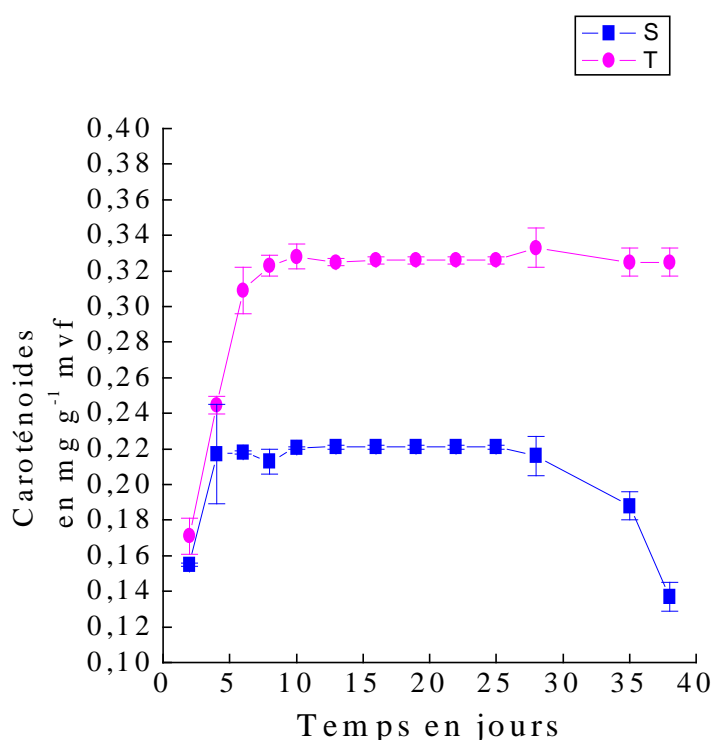


Figure 24 : Effet d'une contrainte hydrique sur l'évolution de la teneur en caroténoïdes en mg.g⁻¹ MVF des feuilles de *Nicotiana sylvestris*.

4.6.3 - Discussion

Pendant les 28 premiers jours (Fig. 23 A et B), l'application d'un arrêt d'arrosage influe sur la teneur en pigments chlorophylliens des feuilles de *Nicotiana sylvestris*. La réduction est d'environ 4 % pour les premiers 6 jours et autour de 25 à 30 % jusqu'au 28^{ème} jour. Ensuite, avec l'augmentation de l'intensité du stress, cet écart s'accroît et il est enregistré une baisse brutale des chlorophylles dans les feuilles stressées.

L'évolution du rapport chl *a* / chl *b* est pratiquement identique pour les deux lots mais à des valeurs inférieures chez les plantes stressées (environ 4 %). La chlorophylle *a* évolue de la même manière que la chlorophylle *b*.

Selon Lawlor et Cornic (2002), un déficit hydrique modéré n'influe pas beaucoup sur la teneur en chlorophylles mais un stress prolongé cause une perte de pigments et conduit à une sénescence.

La réduction des teneurs en chlorophylles, par rapport à celles des plantes témoins, peut être due à un ralentissement de leur synthèse, comme elle peut être liée à une légère dégradation. Le Lay (1998) a montré qu'une réduction du potentiel hydrique provoque un ralentissement de la transformation de la protochlorophyllide en chlorophylle, donc un ralentissement de la synthèse chlorophyllienne.

Le rendement photosynthétique des végétaux dépend des réactions photochimiques de la photosynthèse. Un déficit hydrique provoque une diminution des processus photochimiques chez les plantes vertes. Cette diminution est due à un ralentissement des étapes de la synthèse chlorophyllienne et une altération des interactions pigments- protéines. Ces phénomènes sont liés à une modification de l'ultrastructure des membranes des thylakoïdes, lieu de synthèse des chlorophylles.

Genty et al (1987) ont montré qu'aucun changement sur l'état de capture de photons, encore moins sur la distribution d'énergie entre les deux photosystèmes, n'a été observé chez les plantes de cotonnier soumis à un déficit hydrique modéré. La fluorescence des composants des deux photosystèmes reste relativement constante, montrant qu'un stress peu intense n'altère pas substantiellement les pigments (Lawlor et Cornic, 2002).

Par ailleurs, une certaine stabilisation de la teneur en chlorophylles (Fig. 23A et 23B) et du rapport chl *a* / chl *b* (Tab I) est notée au cours du déficit hydrique, ceci montre que la machinerie photosynthétique n'est pas endommagée par la déshydratation (Cornic et Massaci., 1996), du moins lorsque le stress est faible à modéré.

En situation de manque d'eau, il a été montré dans les feuilles de haricot et de tournesol que la photosynthèse se maintient grâce à la réassimilation du CO₂ libéré lors de la glycolyse et celui contenu dans les espaces intercellulaires (Krampitz et Fock, 1984).

Jusqu'à cette amplitude de stress, nos résultats coïncident bien avec certains travaux notamment sur *Pisum sativum* (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998), où un déficit hydrique modéré n'entraîne pas ou peu de changements dans les pigments et le rapport chl *a* / chl *b* ne change pas significativement entre les témoins (2,6) et les plantes stressées (2,4).

Par la suite, la réduction quantitative dans la photosynthèse peut résulter, selon Loggini et al (1999), de l'influence de la photoinhibition et de la photodestruction des pigments. La photoinhibition est la conséquence d'une efficacité réduite dans la capture des photons par le PSII sous l'effet du stress hydrique (Havaux et al., 1987). De Kouchevsky et Meyer, (1992) ont montré qu'une intensité importante du déficit en eau engendre des dommages sur les deux photosystèmes.

Ces mêmes auteurs ont constaté une réduction importante des taux maximums d'absorption de photons par le PSII lors de l'application de la contrainte hydrique. La diminution est induite

principalement par une perte des centres actifs du PSII. Bien que l'antenne et les protéines des complexes photosynthétiques ne soient pas altérés par l'effet d'un stress hydrique sévère, il est suggéré que c'est la chaîne d'oxydation du PSII qui est endommagée en premier avant que les autres processus ne soient affectés (Baker et Bowyer, 1994).

En effet, chez *Pisum sativum* (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998), l'application d'un déficit hydrique sévère cause la dissipation de la photosynthèse et une réduction substantielle des pigments de 21 à 38 % et une baisse du rapport chl *a* / chl *b* qui passe de 2,6 à 2,3. Chez la variété Teorem F1 de *Solanum melongena* (Kirnak et al., 2001), la teneur en chlorophylles totales est réduite de 55 % suite à une déshydratation sévère par rapport aux plantes témoins.

Chez *Rosmarinus officinalis* (Munné-Bosch et al., 2002), la teneur en chlorophylles chute de 39 % suite à une déshydratation modérée et cette diminution atteint un niveau plus élevé (-47 %) quand le déficit en eau s'accroît. C'est également le cas de *Boea hygroskopica* (Navari-Izzo et al., 2000), une plante tolérante à la dessiccation, où un déficit hydrique sévère entraîne une réduction forte du taux de chlorophylles totales (-76 %) et moindre du rapport chl *a* / chl *b* (-30 %).

Les espèces sensibles aux conditions de déshydratation montrent une diminution importante du rapport chl *a* / chl *b*, conséquence de la diminution de la chl *a*. Ceci a été montré dans les feuilles du *Nerium oleander* (Demmig-Adams et al., 1988), *Pisum sativum* (Moran et al., 1994), *Triticum durum* (Loggini et al., 1999).

Chez une variété de *Triticum durum* (Cv Ofanto), résistante à la déshydratation (Loggini et al., 1999), le rapport chl *a* / chl *b* ne change pas significativement entre les plantes stressées (1,99) et les plantes témoins (2,02). Ceci est également noté chez *Parkinsonia aculeata* (Benadjaoud, 2002) où le rapport chl *a* / chl *b* est constant dans les feuilles de plantules témoins (1,74) et les plantules stressées (1,76).

Sous les conditions de déshydratation, la variété Ofanto de *Triticum durum* ainsi que d'autres espèces résistantes présentent la capacité de sauvegarder intact le contenu et la composition des pigments chlorophylliens. Ceci indique leur capacité à préserver indemne le fonctionnement de l'appareil photosynthétique et un taux net d'assimilation du CO₂ ainsi qu'un taux de croissance similaire à celui des plantes témoins bien irriguées (Navari-Izzo et al., 2000).

- La cinétique d'évolution des caroténoïdes dans les feuilles de *Nicotiana sylvestris* (Fig. 24) suit celle des chlorophylles jusqu'au 25^{ème} jour de l'arrêt d'arrosage. Au-delà, la teneur reste constante pour les témoins et chute brutalement pour les stressées.

Initialement, le taux en caroténoïdes se maintient. Ils interviennent en tant que pigments photoprotecteurs des chlorophylles et assurent la protection de l'appareil photosynthétique (Munné Bosch et al., 1999).

Les caroténoïdes interviennent pour désactiver l'oxygène singulet (¹O₂) en provoquant le quenching (extinction) de l'état triplet excité de la chlorophylle en réduisant indirectement la formation d'espèces d'oxygène singulet (Foyer et Harbinson, 1994) et régulent la dissipation de l'excès d'énergie et le niveau de NADPH⁺, H grâce à un cycle de xanthophylles (Niogi et al., 1998). En effet, sous les conditions de déshydratation, l'inhibition de l'assimilation du CO₂ induit une accumulation de l'énergie sur les LHC (Light-harvesting) et les systèmes de transfert de l'énergie, avec une élévation de l'état réduit des intermédiaires et produits de la chaîne photosynthétique. L'excès d'énergie et l'état réductant des produits sont dissipés par une réaction cyclique des xanthophylles (Lawlor et Cornic, 2002). Dans le cycle des xanthophylles, l'excès d'énergie est dissipé par la conversion de la violaxanthine, via l'anthéroxanthine en zéaxanthine par l'intermédiaire de la violaxanthine de-époxydase (Lawlor et Cornic, 2002).

Quand l'intensité du stress devient plus importante, la réponse des plantes de *Nicotiana sylvestris* est différente selon les auteurs. Ainsi, selon certains, il est observé une augmentation souvent importante des caroténoïdes en situation de déficit hydrique. C'est le cas notamment de *Triticum durum* cv Adamello (Loggini et al., 1999), *Rosmarinus officinalis* (Munné-Bosch et al., 1999), *Parkinsonia aculeata* (Benadjaoud, 2002).

Comme nous, d'autres auteurs ont constaté une chute du taux de caroténoïdes en parallèle avec les chlorophylles. Ceci a été rapporté chez *Pisum sativum* (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998), *Salvia officinalis* (Munné-Bosch et al., 2001) et *Boa hygroskopica*, une espèce tolérante à la dessiccation (Navari-Izzo et al., 2000).

Chez *Salvia officinalis* (Munné-Bosch et al., 2001), la diminution de la TRE autour de 50 %, entraîne une réduction du taux de caroténoïdes parallèlement à la réduction de la chlorophylle. En effet, le taux des composants du cycle des xanthophylles diminue d'environ 62 % chez les plantes déshydratées. Cette diminution est observée avec celle d'autres xanthophylles, lesquels diminuent de 72 %. Ceci entraîne une détérioration des membranes photosynthétiques, d'où altération du chloroplaste entraînant ainsi la sénescence.

Le dysfonctionnement de l'appareil photosynthétique suite à la déshydratation peut entraîner la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Cette diminution du taux des caroténoïdes engendre par conséquent une faible protection des chloroplastes des plantes de tabac stressées contre le stress oxydatif.

5 – Conclusions générales

Les plantes de *Nicotiana sylvestris* répondent à la déshydratation par une suite d'évènements en relation avec l'intensité du stress.

La première phase va du 2^{ème} au 6^{ème} jour : les teneurs relatives en eau des feuilles et du substratum se maintiennent. Les teneurs en proline libre, sucres solubles, protéines hydrosolubles ainsi que l'intégrité membranaire ne montrent pas de différences significatives avec les plantes témoins. Par ailleurs, la synthèse des pigments photosynthétiques et caroténoïdes est inférieure à celle des témoins.

La deuxième phase va du 6^{ème} au 25^{ème} jour. La teneur relative en eau continue à rester stable pour les stressées quoique à des valeurs inférieures par rapport aux témoins. Cette légère diminution de la teneur relative en eau induit très rapidement la mise en place d'un système de synthèse graduelle qui permet l'accumulation de la proline libre et des sucres solubles. Ce système nécessite une régulation génétique.

L'accumulation de la proline libre apparaît comme étant la première manifestation de l'application de la contrainte hydrique. Son accumulation est plus accentuée avec la diminution de la teneur relative en eau. A l'opposé, les sucres solubles ne commencent à s'accumuler qu'à une faible teneur relative en eau.

A ce niveau, les deux osmolytes maintiendraient une pression osmotique (à travers une rétention suffisante en eau) permettant à la plante de conserver son métabolisme et ses fonctions vitales. En effet, les plantes vont interagir au déficit hydrique en fabriquant dans le cytosol des molécules de faible poids moléculaire (proline, sucres...) pour ajuster leur pression osmotique. Cet ajustement osmotique augmente l'influx de l'eau qui permet de maintenir une certaine turgescence cellulaire à un niveau aussi élevé que possible, par des potentiels hydriques foliaires faibles aussi bien dans le mesophylle qu'au niveau des cellules de garde (Hopkins, 1999). Notons également que la proline provient d'une néosynthèse.

La diminution de la teneur relative en eau ne limite aucunement le déroulement des divers processus du métabolisme cellulaire. En effet, les teneurs en protéines, bien qu'inférieures par rapport à celles enregistrées chez les plantes témoins, demeurent dans l'ensemble stables. Cette réduction est peut être liée à un dysfonctionnement de la protéogénèse, due à la perturbation dans le fonctionnement des enzymes ou à une certaine protéolyse.

L'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes cellulaires estimée en termes d'efflux d'ions est maintenue grâce à une accumulation de solutés compatibles qui gardent les surfaces des membranes hydratées leur assurant ainsi un fonctionnement optimum.

Ces processus métaboliques n'ont lieu que lorsque l'intégrité fonctionnelle de l'appareil photosynthétique est intacte. Quoiqu'une réduction dans la teneur en pigments photosynthétiques soit enregistrée par rapport aux témoins, elle demeure dans l'ensemble stable. Ce maintien est une preuve de la conservation de cette intégrité.

La diminution de la teneur relative en eau des feuilles en relation avec dessèchement du substratum, agit sur la croissance des plantes. Les plantes de tabac stressées répondent aux conditions d'arrêt d'arrosage par un développement du système racinaire par rapport aux parties aériennes.

Le changement dans le rapport Partie aérienne / racine, signifie que la grande proportion des assimilats de la plante sont orientés vers le système racinaire d'où sa croissance importante. La diminution du rapport partie aérienne / racine, quand les provisions en eau du sol sont limitées, est un avantage. Ceci améliore la capacité du système racinaire à extraire plus d'eau par l'exploration d'un volume plus important du sol pour le maintien des fonctions vitales dans toute la plante en attendant la levée du stress. Il y a, donc, une faible disponibilité de produits en direction des parties aériennes, ce qui ne leur assure pas une croissance convenable. Ceci peut être bénéfique dans la mesure où une surface foliaire plus petite conduit à une transpiration plus faible.

A partir du 25^{ème} jour (3^{ème} phase), une diminution plus importante de la teneur relative en eau stimule encore plus les systèmes mis en place pour la rétention de l'eau. Les photosynthétats peuvent être réorientés vers d'autres synthèses d'où accumulation accrue en proline libre et sucres solubles. En effet, l'accumulation de la proline est six fois plus importante que celle enregistrée chez les plantes témoins et les teneurs en sucres solubles atteignent un niveau deux fois plus important.

A ce stade, la dégradation des protéines est accélérée. Ceci renforce encore plus le pool de proline libre et d'acides aminés.

L'accumulation accrue des sucres solubles est peut être renforcée soit par un ralentissement de leur utilisation par les différentes voies métaboliques, soit par une accélération dans la dégradation de l'amidon par une stimulation de l'activité amylolytique. A ce niveau, les deux osmolytes agiront comme agents protectants des structures membranaires et des protéines enzymatiques.

Du 25 au 28^{ème} jour, on observe une chute de la teneur en chlorophylles et celle des caroténoïdes. Ceci signifie que le fonctionnement de la photosynthèse est altéré. La réduction quantitative dans la photosynthèse peut résulter de l'influence de la photoinhibition et de la photodestruction des pigments (suite à la dégradation des caroténoïdes). Ainsi, la sénescence est accélérée d'où jaunissement des feuilles.

Le dysfonctionnement de l'appareil photosynthétique suite à la déshydratation peut entraîner la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Cette diminution du taux des caroténoïdes engendre par conséquent une faible protection des chloroplastes des plantes de tabac stressées contre le stress oxydatif.

La réduction dans les photosynthétats et leur allocation vers les racines devient importante, ce qui va agir encore plus sur les parties aériennes, d'où leur faible croissance comparativement au système racinaire.

Les stades ultimes précédant la mort consistent également en une altération de la compartimentation membranaire. Ces changements sont liés à la présence de radicaux libres qui, conjointement avec les enzymes de dégradation (protéases, lipases, hydrolases...), participent à la détérioration des structures membranaires d'où fuite de l'eau, de solutés, d'ions, etc..... entraînant, à la fin, la mort cellulaire.

La suite d'évènements sus-cités répond dans l'ensemble au schéma de Larcher (1995) représentant les différentes phases induites par un stress hydrique suite à son intensification.

La première phase allant du 2^{ème} au 6^{ème} jour correspond à **la phase d'alarme** où aucun signe de résistance de la part des plantes stressées n'apparaît. Ceci se manifeste par un comportement similaire entre les plantes témoins et stressées. A cette phase succède une deuxième allant du 6^{ème} au 22^{ème} jour et correspondant à **la phase de résistance**. A ce niveau, le maintien de la croissance et des activités vitales est assurée par le phénomène de l'ajustement osmotique via l'accumulation de solutés compatibles (proline et sucres solubles).

A partir du 25^{ème} jour, **la phase d'épuisement** s'installe. En effet, l'intensité du déficit hydrique augmentant, ceci mène à l'effondrement des activités métaboliques et physiologiques des plantes.

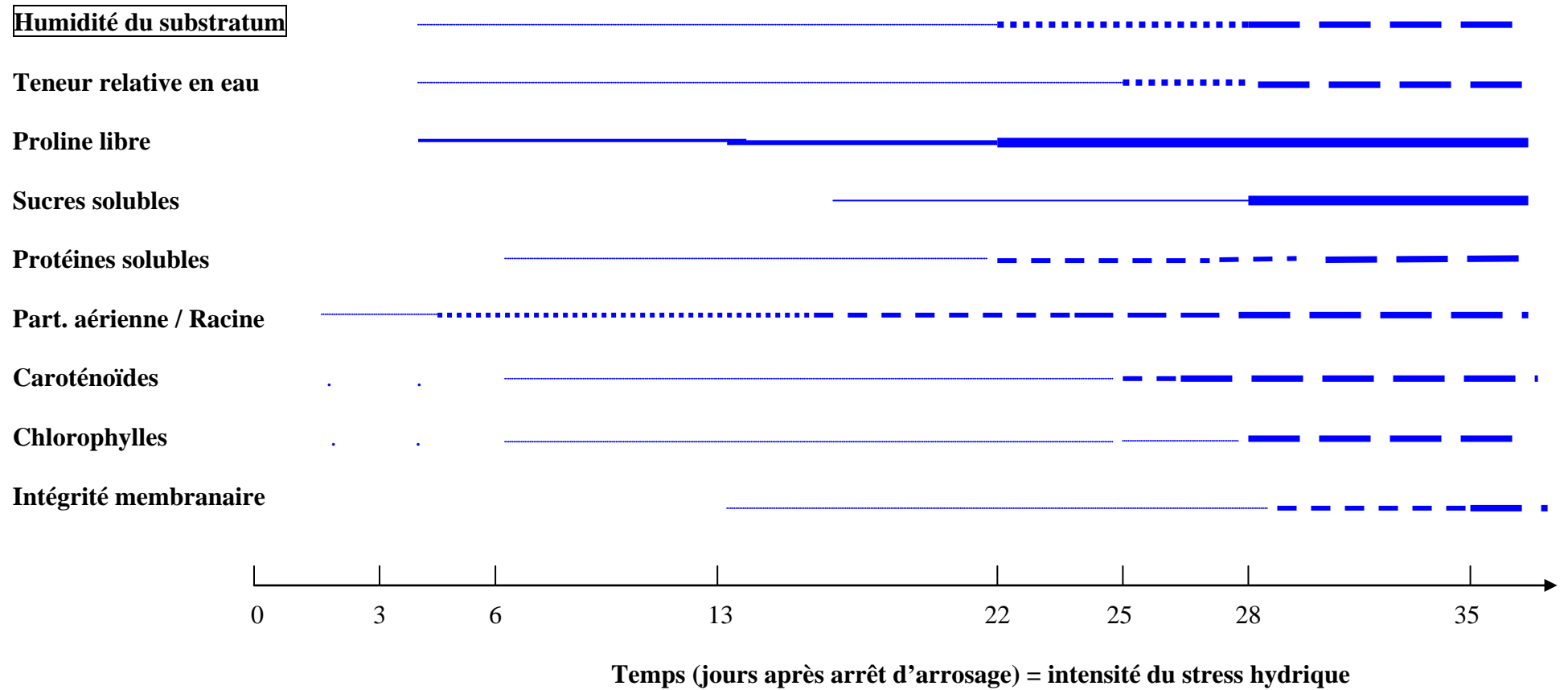


Figure 8 : Chronologie des différents événements physiologiques suite du dessèchement du substratum

Augmentation  Diminution 

Les plantes de *Nicotiana sylvestris* ont montré une résistance vis à vis du déficit hydrique. Cette bonne tolérance est due à une capacité de maintenir une turgescence des tissus à travers une importante rétention d'eau. Cet équilibre hydrique serait réalisé, d'un côté, par une faible évapotranspiration en régulant le mouvement des stomates et, d'un autre côté, par la mise en place d'un ajustement osmotique grâce à l'accumulation de solutés compatibles. Ces réajustements vont permettre le déroulement des fonctions vitales des plantes.

Il serait intéressant d'approfondir certaines réponses du tabac au stress hydrique par une étude plus fine de quelques mécanismes de résistances tels que la nature des sucres solubles accumulés, la régulation des mouvements des stomates, etc..... En outre, le degré de résistance de *Nicotiana sylvestris* peut être mieux cerné et apprécié en appliquant des cycles de déshydratation-réhydratations afin de simuler les conditions du milieu.

Dans l'avenir, il serait souhaitable d'approfondir ce travail par une étude comparative du mutant de *Nicotiana sylvestris* CMS2 qui, lui, s'avère plus résistant au déficit hydrique.

6 – Références bibliographiques

1. **Adjohosson DF.** 1983. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq). Thèse de doctorat d'état. Université Paris VII.
2. **Albouchi A, Ghrir R, El Aouni MH.** 1997. Endurcissement à la sécheresse et accumulation de glucides solubles et d'acides aminés libres dans les phyllodes d'*Acacia cyanophylla* Lindl.
3. **Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E.** 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* **24**, p1337.
4. **Andrade JL, Saavedra L, Trejo CL.** 1995. Proline accumulation in leaves of four cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. With different drought resistance. *Phyton* **57**, 149-157.
5. **Asthan J, Delavney AJ, Desh-Pal S, Verma D.** 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* **4**, 215-223.
6. **Badji M, Feyen J.** 1995. Relations hydriques sol- plante- atmosphere. In: Agronomie moderne, eds. Haltier-AUPELF/UREF, TURIN, p.545.
7. **Baker NR, Bowyer JR.** 1994. Photoinhibition of photosynthesis. From molecular mechanisms to the field. In: Baker NR, Bowyer JR, eds. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
8. **Barr HD, Weatherley PE.** 1962. Re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal Biology Science* 543-428.
9. **Barrieu F, Marty-Mazars D, Thomas D, Chaumont F, Charbonnier M, Marty F.** 1999. Dessiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin Bob TIP26-1 in cauliflower cells. *Planta* **209**, 77-86.
10. **Bates LS, Waldren RP, Teare ID.** 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39**, 205-207.
11. **Belarbi et Monneveux.** 1988 in **Hammidouche et Izgueur.** 1997.
12. **Benadjaoud A.** 2002. Effet de la déshydratation et de la réhydratation sur le métabolisme cellulaire de jeunes plantules de *Parkinsonia aculeata* L: Aspects physiologiques. Thèse de Magister. USTHB, Alger.
13. **Bensari M.** 1989. Répartition du carbone photosynthétique entre le saccharose et l'amidon dans la feuille de soja; influence d'un déficit hydrique. Thèse de Doctorat, Biochimie appliquée. Université de Constantine.
14. **Blatt MR, Grabov A.** 1997. Signalling gates in Abscisic acid-mediated control of guard cell ion channels. *Plant Physiology* **100**, 481-490
15. **Bonetta D, McCourt P.** 1998. Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends in Plant Science* **6**, 231-235.

- 16. Bonhert HJ, Sheveleva E.** 1998. Plant stress adaptations-making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 267-274.
- 17. Boyer.** 1965. In **Hammidouche et Izgueur**, 1997.
- 18. Bradford M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgramm quantities of protein using the principles of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* **72**, 248-254.
- 19. Bradford KJ, Hsiao TC.** 1982. Physiological responses to moderate water stress. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Serie, vol 2B, *Physiological Plant Ecology II*, Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 325-378.
- 20. Bray E.** 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* **13**, 1035-1040.
- 21. Bray EA.** 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**, 48-54.
- 22. Broin M, Cui n  S, Peltier G, Rey P.** 2000. Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS Letters* **467**, 245-248.
- 23. Bussis D, Heineke D.** 1998. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. *Journal Experimental Botany* **49**, 1361-1370.
- 24. Calmes JV, Vialer G, Gelfi N, Blanchet R.** 1985. Influence du déficit hydrique sur trois variétés de soja, effets sur la protéogénèse des graines. *Agronomie* **3**, 169-176.
- 25. Cascardo JC, Almeida RS, Buzeli RA, Carolino SM, Otoni WC, Fontes EP.** 2000. The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 14494-14500.
- 26. Castrillo M.** 1992. Sucrose metabolism in bean plants under water deficit. *Journal of Experimental Botany* **43**, 1557-1561.
- 27. Cerning et Beroard.** 1975. A note on sugar determination by anthron method. *Cereal Chimie* **52**, 857-860.
- 28. Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R.** 2001. Aquaporins Constitute a Large and Highly Divergent Protein Family in Maize. *Plant Physiology* **125**, 1206-1215.
- 29. Chen CT, Li CC, Kao CH.** 1991. Senescence of rice leaves XXXI. Changes of chlorophyll, protein and polyamin contents and ethylene production during senescence of a chlorophyll-deficient mutant. *Journal Plant Growth Reg* **10**, 201-205.
- 30. Chen H, Kuang B, Wang J.** 1995. Studies on selection and characterization of a stress tolerant sugarcane cell line. *Chin. Journal of Biotechnology* **11**, 93-99.
- 31. Clarke JM, Mc Caig TN.** 1982a. Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Science* **22**, 503-506.

- 32. Clifford SC, Arndt SK, Corlett JE, Joshi S, Sankhla N, Popp M, Jones HG.** 1998. The role of solute accumulation, solute adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Zizyphus mauritiana* Lamk. *Journal of Experimental Botany* **49**, 967-977.
- 33. Close TJ.** 1996. Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Plant Physiology* **97**, 795-803.
- 34. Cornic G, Massaci A.** 1996. Leaf photosynthesis under drought stress. In/ Baker NR, ed. *Photosynthesis and the Environment*. Advance in photosynthesis. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 347-366.
- 35. Cuming AC.** 1999. LEA proteins. In: Shewry PR, CaseyR, eds. *Seeds proteins*. Kluwer academic Publishers, 753-780.
- 36. Curti G, Massardi F, Lado P.** 1993. Synergistic activation of plasma membrane H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana* cells by turgor decrease and by fusicoccin. *Physiologia Plantarum* **87**, 592-600.
- 37. D'Aoust AL, Hubac C.** 1986. Effect de l'état du phytochrome sur l'efflux de solutés des disques de limbes foliaires de cotonnier. *Canadian Journal Botany* **64**, 2973-2975.
- 38. Dasguta, Bewley.** 1984 : In **Mazliak et Laval Martin.** 1995.
- 39. Dassa-Girard M.** 1987. Etude comparée des activités phosphatasiques acides et des paramètres hydriques foliaires de cultivars de mil (*Pennisetum americanum* L), soumis à des contraintes hydriques. Thèse de Doctorat. Université Paris VII, Paris.
- 40. De Kouchkowsky Y, Meyer S.** 1992. Inactivation of chloroplast ATPase by in vivo decrease of water potential. In: Murata N, ed. *Research in Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrescht, 709-712.
- 41. Dejardin A, Sokolov LN, Klezkowski LA.** 1999. Sugar /osmotincum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* **344**, 503-509.
- 42. Delauney AJ, Verma DP.** 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* **4**, 215-223.
- 43. Deleu C, Coustau M, Niogret MF, Larher F.** 1999. Three new osmotic stress-regulated cDNA identified by differential display polymerase chain reaction in reseed leaf discs. *Plant, Cell and Environment* **22**, 979-988.
- 44. Demmig B, Winter K, Krüger A, Czygan FC.** 1988. Zeaxanthine and heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiology* **87**, 17-24.
- 45. Diaz P, Wilson A, Tunwilson AI.** 1993. Immunocutochemical analysis of proteolysis in germinating soy bean. *Phytochemistry* **33**, 961-968.
- 46. Djebbar R.** 2001. Publication en cours.

- 47. Du YC, Nose A, Wasano K, Uchida Y.** 1998. Responses to water stress of enzyme activities and metabolite levels in relation to sucrose and starch synthesis, the calvin cycle and the C4 pathway in sugarcane (*Saccharum sp.*)leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**, 253-260.
- 48. Durand JL, Onillon B, Schnyder H, Rademacher I.** 1995. Drought effects on cellular and spatial parameters of leaf growth in tall fescue. *Journal Experimental Botany* **46**, 1147-1155.
- 49. Dure L. III, Greenway SC, Galau G.** 1981. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. XIV. Changing mRNA populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* **20**, 4162-4168.
- 50. El Haffid L.** 1986. Action de la secheresse sur l'activité des enzymes hydrolitiques de la phosphatidylcholine des feuilles de cotonnier (*Gossypium hirsutum* cv. Mocoshino). Mémoire du 3^{ème} cycle. Université Paris VII.
- 51. Eymery F, Rey P.** 1999. Immunocytolocalization of CDSP32 and CDSP34, two chloroplastic drought-induced stress proteins in *Solanum tuberosum* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 305-312.
- 52. Epand RM.** 1998. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* **906**, 353-368.
- 53. Feder ME, Hoffmann GE.** 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* **61**, 243-282.
- 54. Ferrario-Méry S, Valadier MH, Foyer CH.** 1998. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant Physiology* **117**, 293-302.
- 55. Foyer CH, Descourvière P, Kunert KJ.** 1994. Protection against oxygen radicals: An important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* **17**, 507-523.
- 56. Foyer CH, Harbinson J.** 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: Foyer CH, Mullineaux PM, eds. *Causes of photooxydative stress and amelioration of defense system in plants*. CRS Press, boca Raton, FL, 1-42.
- 57. Fray RG, Wallace A, Grierson D, Lycett GW.** 1994. Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant Molecular Biology* **47**, 299-325.
- 58. Fu J, Huang B.** 2001. Involvement of antioxydants and lipid peroxydation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* **45**, 105-114.
- 59. Garcia AB, Engler JA, Iyer S, Gerats T, van Montague M.** 1997. Effects on osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiology* **115**, 159-169.

- 60. Geigenberger P, Reimholz R, Geiger M, Merlo L, Canale V, Stitt M.** 1997. Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta* **201**, 502-518.
- 61. Genty B, Briantais JM, Vieira DA Silva JB.** 1987. Effects of drought on primary photosynthetic processes of cotton leaves. *Plant Physiology* **83**, 360-364.
- 62. Gerbeau P, Gùçlù J, Ripoche P, Maurel C.** 1999. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *The Plant Journal* **18**, 577-587.
- 63. Granier C, Tardieu F.** 1999. Water deficit and spacial pattern of leaf development. *Plant Physiology* **119**, 609-620.
- 64. Granier C, Inzé D, Tardieu F.** 2000. Spacial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34cdc2 Kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiology* **124**, 1393-1402.
- 65. Guignard JL.** 2000. Biochimie végétale. DEUG SV. Pharmacie. CAPES, eds2. Dunod, Paris sud.
- 66. Hamidouche T, Izgueur N.** 1997. Comportement de deux variétés de blé dur (*Triticum durum*) : HEDBA 3 et H3 X GDO soumises à différentes intensités de stress salin. Mémoire de DES, *Physiologie Végétale*, USTHB, Alger.
- 67. Hamilton DW, Hills A, Kôhler B, Blatt MR.** 2000. Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarisation and abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 4967-4972.
- 68. Handa S, Bressan RA, Handa AK, Carpita NC, Hasegawa PM.** 1983. Solute contribution to osmotic adjustment in cultured plant cell adapted to water stress. *Plant Physiology* **73**, 834-843.
- 69. Hanson AD, Hitz WD.** 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annual Review Plant Physiology* **33**, 168-203.
- 70. Hare PD, Cress WA, Van Staden J.** 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* **21**, 535-553.
- 71. Hartung W, Radin JW, Hendrix DL.** 1998. Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. *Plant Physiology* **86**, 908-913.
- 72. Havaux M, Canaani O, Malkin S.** 1987. Inhibition of photosynthetic activities under slow water stress measured in vivo by the photoacoustic method. *Physiologia Plantarum* **70**, 503-510.
- 73. Havaux M, Niogy KK.** 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxydative damage by more than one mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 8762-8767.

- 74. Hayashi F, Ichino T, Osanai K.** 2000. Oscillation and regulation of proline content by P5CS and proDH gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant and Cell Physiology* **41**, 1096-1101.
- 75. Heikkila JJ, Papp JET, Schultz GA, Bewley JD.** 1984. Induction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyle by water stress, abscisic acid and wounding. *Plant Physiology* **76**, 270-274.
- 76. Hellmann H, Funck D, Rentsch D, Frommer WB.** 2000. Hypersensitivity of an Arabidopsis sugar signalling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiology* **123**, 779-790.
- 77. Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T, Shinozaki K.** 1995. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 3903-3907.
- 78. Hirt H.** 1997. Multiple roles of MAP Kinases in plant signal transduction. *Trends in Plant Science* **2**, 11-15.
- 79. Ho TH, Mishkind ML.** 1991. The influence of water deficits on mRNA levels in tomato. *Plant, Cell and Environment* **14**, 75-76
- 80. Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J.** 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* **6**, 431-438.
- 81. Hong Z, Lakkeneni K, Zhang, Verma DP.** 2000. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* **122**, 1129-1136.
- 82. Hopkins WG.** 1999. Introduction to plant physiology, eds2. William G Hopkins, New york.
- 83. Hua XJ, Van de Cotte B, Van Montagu M, Verbruggen N.** 1997. Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **114**, 1215-1224.
- 84. Hubac C, Vieira Da Silva J.** 1980. Indicateurs métaboliques de contraintes hydriques. *Physiologie végétale* **18**, 45-53.
- 85. Igarashi Y, Yoshiba Y, Sanada Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Shinozaki K.** 1997. Caractérisation of the gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Molecular Biology* **33**, 857-865.
- 86. Ingram J, Bartels D.** 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 377-403.
- 87. Ingram J, Chandler JW, Gallagher L, Salamini F, Bartels D.** 1997. Analysis of cDNA clones encoding sucrose phosphate synthase in relation to sugar interconversions associated with dehydration in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant Physiology* **115**, 113-121.

- 88. Irving HR, Gehring CA, Parish RW.** 1992. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proceeding Natural Academic Science USA* **89**, 1790-1794.
- 89. Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo PR, Arrese-Igor C, Becana M.** 1998. Oxidative Damage in Pea Plants Exposed to Water Deficit or Paraquat. *Plant Physiology* **116**, 173-181.
- 90. Iyer S, Caplan A.** 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiology* **16**, 203-211.
- 91. Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Ek B, Kejellbom P.** 1998. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *The Plant Cell* **10**, 451-459.
- 92. Joyard J, Teyssier E, Miegé C, Berny-Seigneurin D, Marechal E, Block NA, Dorne AJ, Rolland N, Ajlani G, Douce R.** 1998. The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiology* **118**, 715-723.
- 93. Kaldenhoff R, Grote K, Zhu JJ, Zimmermann U.** 1998. Significance of plasmalemma aquaporins for water transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **14**, 121-128.
- 94. Kermode AR.** 1997. Approaches to elucidate the basis of desiccation tolerance in seeds. *Seed Sciences Research* **7**, 75-95.
- 95. Kim JY, Mahé A, Brangeon J, Prioul JL.** 2000. A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/Tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology* **124**, 71-84.
- 96. King SW, Vierling RA, Nguyen HT.** 1992. Changes in mRNA species during drought stress in winter wheat. *Crop Sciences* **32**, 822-825.
- 97. Kirch HH, Vera-Estrella R, Golldack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ, Bonhert HJ.** 2000. Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology* **123**, 111-124.
- 98. Kirnak HK, Gengiz K, David H, Sinan G.** 2001. Long-term experiment to study the role of mulches in physiology and macro-nutrition of strawberry grown under water stress. *Australian Journal Agriculture Resources* **52** (9) (In Press).
- 99. Kirnak H, Gengiz K, Ismail T, David H.** 2001. The influence of water deficit on vegetative growth, physiology, fruit yield and quality in Egg plants. *Bulgare Journal Plant Physiology* **27**, 34-46.
- 100. Kiyosue T, Yoshida Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by hydration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **8**, 1323-1335.
- 101. Klann EM, Hall B, Bennett AB.** 1996. Antisense acid invertase (TIVI) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiology* **112**, 1321-1330.

- 102. Kleines M, Elster RC, Rodrigo MJ, Blervacq AS, Salamini F Bartels D.** 1999. Isolation and expression analysis of two stress responsive sucrose-synthetase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* **209**, 13-24.
- 103. Knight H.** 2000. Calcium signalling during abiotic stress in plants. *International Review of Cytologie* **195**, 269-324.
- 104. Koch KE.** 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 509-540.
- 105. Kramer PJ. 1969.** Plant and soil water relationship: a model synthesis, eds. Mc Graw-Hill Book Company 482 p, NewYork.
- 106. Kramer PJ.** 1983. Problems in water relations of plants and cells. *International Review Cytology* **85**, 253-286.
- 107. Krampitz MJ, Fock HP.** 1984. ¹⁴CO₂ assimilation and carbon flux in the calvin cycle and bean leaves. *Phytosynthetica* **18**, 329-337.
- 108. Krause KP, Hill L, Reimholz R, Nielsen TH, Sonnewald U, Stitt M.** 1998. Sucrose metabolism in cold-stored potato tubers with decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant, Cell and Environment* **21**, 285-299.
- 109. Ladigues PV.** 1975. Some aspects of tissue water relations in three populations of *Eucalyptus viminalis* Labill. *New Phytology* **69**, 501-513.
- 110. Larcher W.** 1995. Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups, eds. *Springer*, Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- 111. Larsson.** 1992. In **Hopkins**, 1999.
- 112. Lawlor DW.** 1994. The effects of water deficit on photosynthesis. In: Schulze ED, Caldwell MM, eds. *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer Verlag, Berlin, 129-160.
- 113. Lawlor DW, Cornic G.** 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficit in higher plants. *Plant, Cell and Environment* **25**, 275-294.
- 114. Lecoeur J, Wery J, Ture O, Tardieu F.** 1995. Expression 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.
- 115. Lelay P, Eullafray P, Popovic R.** 1998. L'assemblage du photosystème II en condition de stress hydrique chez l'orge. Congrès ACFAS (1998), communication présentée au congrès, session S-104 : Biologie et Ecologie Végétale.
- 116. Liljenberg CS, Kates M.** 1984. Changes in lipid composition of root membranes as a function of water deficit stress. *Canadian Journal Biochemistry Cell Biology* **63**, 72-84.
- 117. Linchtenthaler HK.** 1987. Chlorophylls and carotenoides: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 349-382.

- 118. Linchtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M. 1997.** Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplast proceeds via a mevalonate-independent pathways. *FEBS Letters* **400**, 271-274.
- 119. Lindquist S, Craig EA. 1988.** The heat shock proteins. *Annual Review Genetic* **22**, 631-677.
- 120. Loggini B, Scartazza A, Brugnoli E, Navari-Izzo F. 1999.** Antioxidative defense system, pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology* 1091-1099.
- 121. Lois LM, Rodriguez-Concepcion M, Gilego F, Campos N, Boronat A. 2000.** Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development : regulatory role of 1-deoxy D-xululose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal* **22**, PP503.
- 122. Lu Z; Neumann PM. 1999.** Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in Rice seedlings but not the transport of water via Mercury-Sensitive Water Channels in the roots. *Plant Physiology* **120**, 143-152.
- 123. Maldonado CA, Zuniga GE, Corcuera LJ, Alberdi M. 1997.** Effect of water stress on frost resistance of oat leaves. *Environmental and Experimental Botany* **38**, 99-107.
- 124. Mariaux JB, Bockel C, Salamini F, Bartels D. 1998.** Dessication-and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular biology* **38**, 1089-1099.
- 125. Matile P, Hörtensteiner S, Thomas H, Kräutler B. 1996.** Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiology* **112**, 1403-1409.
- 126. Mazliak P. 1998.** Croissance et Développement. Physiologie végétale II, ed. *Sciences et arts Hermann*.
- 127. Mc Cready RM, Guggoz J, Silveria V, Owensh S. 1950.** Determination of starch and amylose in vegetables. *Annals of Chemistry* **22**, 1156-1160.
- 128. Mc Donald SD, Archbold D. 1998.** Membrane competence among and within *Fragaria* species varies in response to dehydration stress. *Journal American Society Horticulture Science* **123** (5), 808-813.
- 129. Merah O, Monneveux P, Deleens E. 2001.** Relationships between flag leaf carbon isotope discrimination and several morphophysiological traits in durum wheat genotypes under mediterranean conditions. *Environmental and Experimental Botany* **45**, 63-71.
- 130. Meyer S, 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.
- 131. Mironov V, De Veylder L, Van Montagu M, Inzé D. 1999.** Cyclin-dependent Kinases and cell division in plants the nexus. *The Plant Cell* **11**, 509-522.

- 132. Mittler R, Zillinskas BA.** 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal* **5**, 397-405.
- 133. Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K.** 1997. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein Kinases (MAPKs). *Trends in Biotechnology* **15**, 15-19.
- 134. Monneveux P; This D, Belhassen E.** 1995. L'adaptation génétique face aux contraintes de sécheresse. *Cahiers Agricultures* **4**, 251-261.
- 135. Moran JF, Beneca M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Tejo P.** 1994. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* **194**, 346-352.
- 136. Morimoto RI.** 1993. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* **259**, 1409-1410.
- 137. Müller J, Sprenger N, Bortlik K, Boller T, Wiemken A.** 1997. Dessication increases sucrose level in *Ramonda* and *Harberlea*, two genera of resurrection plants in the Gesneriaceae. *Physiologia Plantarum* **100**, 153-158.
- 138. Munné-Bosch S, Schwarz K, Alegre L.** 1999. Enhanced formation of α -tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. *Plant Physiology* **121**, 1047-1052.
- 139. Munné-Bosch S, Jubany-Mari T, Alegre L.** 2001. Drought induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant, Cell and Environment* **24**, 1319-1327.
- 140. Munné-Bosch S, Carbonell ML, Alegre L, Onckelen van HA.** 2002. Effect of drought and high solar radiation on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid concentrations in *Rosmarinus officinalis* plants. *Physiologia Plantarum* **114**, 380-386.
- 141. Murahama M, Yoshida T, Hayachi F, Ichino T, Sanada Y, Wada K.** 2001. Purification and characterization of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase isoenzymes, indicating differential distribution in spinach (*Spinacea oleracea*) leaves. *Plant and Cell Physiology* **42**, 742-750.
- 142. Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1998. A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **118**, 1233-1241.
- 143. Nambara E, Kawaide H, Kamiya Y, Naito S.** 1998. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. *Plant Cell Physiology* **39**, 853-858.
- 144. Navari-Izzo F, Sgherri CLM, Izzo R, Quatarcci MF.** 1992. Proline accumulation related to water status in sunflower seed lings subjected to drought. *Agr Med* **122**, 269-274.

- 145. Navari-Izzo F, Teresa M, Milone, Mike F, Quartacci, Pinzino C.** 1993. Metabolic changes in wheat plants subjected to a water deficit stress programme. *Plant Science* **92**, 151-157.
- 146. Navari-Izzo F, Quatacci MF, Pinzino C, Rascio N, Vazzana C, Sgherri CL.** 2000. Protein dynamics in thylakoids of the desiccation tolerant plant *Boea hygroskopica* during dehydration and rehydration. *Plant Physiology*, **124**, 1427-1436.
- 147. Neill S, Desikan R, Claarke A, Hancock.** 1999. H₂O₂ signalling in plant cells. In: Smallwood MF, Calvert CM, Bowles DJ, eds. *Plant responses to environmental stress*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 59-64.
- 148. Niyogi KK, Grossman AR, Björkman O.** 1998. Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *The Plant Cell* **10**, 1121-1134.
- 149. Nogues S, Allen DJ, Morison JI, Baker NR.** 1998. Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development, and photosynthesis in droughted pea plants. *Plant Physiology* **117**, 173-181.
- 150. Nogues S, Baker NR.** 2000. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal Experimental Botany* **51**, 1309.
- 151. Nover L, Scharf KD, Neumann D.** 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particules and are associated with a specific set of mRNAs. *Molecular Cell Biology* **9**, 1298-1308.
- 152. Olsson M.** 1995. Alterations in lipid composition, lipid peroxydation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **33**, 547-553.
- 153. Osmond B, Bagder M, Maxwell K, Björkman O, Leegod R.** 1997. Too many photons : photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sciences* **2**, 119-120.
- 154. Ouedraogo M.** 2000. Etude biologique et physiologique du pourghère (*Jatropha curcas* L) en tant que source alternative de carburant de substitution. Diplôme d'Etudes Approfondies (Biologie et Physiologie Végétale), Faculté des Sciences et Techniques, Université de P et M Currie - Paris VI.
- 155. Pelleschi S, Rocher JP, Prioul JL.** 1997. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant, Cell and Environment* **20**, 493-503.
- 156. Pelleschi S, Guy S, Kim JY, Pointe C, Mahé A, Barthes L, Leonardi A, Prioul JL.** 1999. Ivr2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene - specific expression under water stress. *Plant Molecular Biology* **39**, 373-380.
- 157. Peng Z, Lu Q, Verma DP.** 1996. Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Molecular Gene Genetic* **253**, 334-341.

- 158. Pérez-Alfocea F, Estan MT, Caro M, Guerrier G.** 1993. Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. Pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. *Plant Physiology* **87**, 493-498.
- 159. Pérez-Alfocea F, Larher F.** 1995. Effects of phlorizin and *p*-chloromercuribenzenesulfonic acid on sucrose and proline accumulation in detached tomato leaves submitted to NaCl and osmotic stresses. *Journal Plant Physiology* **145**, 367-373.
- 160. Pessaraki M.** 1999. Hand book of plant and crop stress. Eds2, University of Arizona, Tucson, Arizona.
- 161. Premachandra GS, Sancoka H, Fufita K, Ogata S.** 1992. Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane competence, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. *Journal Experimental Botany* **43**, 1569-1576.
- 162. Ramanjulu S, Bartels D.** 2002. Drought-and dessication-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* **25**, 141-151.
- 163. Rascio A.** 1988. The accumulation of solutes under water deficit. *Plant Physiology* **90**, 715-721.
- 164. Rathinasabapathi B.** 2000. Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany* **25**, 709-716.
- 165. Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr.** 1993. The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparison, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. *Critical Review Biochemical Molecular Biology* **28**, 235-257.
- 166. Rey P, Pruvot G, Becuwe N, Eymery F, Rumeau D, Peltier G.** 1998. A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. *Plants. The Plant Journal* **13**, 97-107.
- 167. Rey P, Gillet B, Rômer S, Eymery F, Massimino J, Peltier G, Kuntz M.** 2000. Over-expression of a pepper plastid lipid associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *The Plant Journal* **21**, 483-494.
- 168. Richter G.** 1993. Physiologie et Biochimie. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*. 4^{ème} exp. France (525).
- 169. Roitsch T.** 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 198-206.
- 170. Roosens NH, Thu TT, Iskandar HM, Jacobs M.** 1998. Isolation of ornithine- δ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **117**, 263-271.
- 171. Rubeinstein B.** 1982. Regulation of H⁺ excretion. Effect of osmotic shock. *Plant Physiology* **69**, 939-944.

- 172. Sales K, Brandt W, Rumbak E, Lindsey G.** 2000. The LEA-like protein HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica et Biophysica Acta* **1463**, 267-278.
- 173. Sarda X, Tusch D, Ferrare K, Legrand E, Dupuis JM, Casse-Delbart F, Lamaze T.** 1997. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *The Plant Journal* **12**, 1103-1111.
- 174. Scandalios JG, Guan L, Polidoros AN.** 1997. Catalases in plants: Gene structure, properties, regulation and expression. In: Scandalios JG, ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 343-398.
- 175. Schuppler U, He PH, Joohn PC, Munns R.** 1998. Effect of water stress on cell division and cell-division cycle 2-like cell cycle Kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiology* **117**, 667-678.
- 176. Schurr U, Heckenberger U, Herdel K, Walter A, Feil R.** 2000. Leaf development in *Ricinus communis* during drought stress: dynamics of growth processes of cellular structure and of sink-source transition. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1515-1529.
- 177. Schwacke R, Grallath S, Breitkeuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D.** 1999. Le ProT1, a transporter for proline, glycine betaine and γ -amino butyric acid in tomato pollen. *The Plant Cell* **11**, 377-391.
- 178. Selye H.** 1936. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* **138** : 32.
- 179. Selye H.** 1973. The evolution of stress concept. *Am Sciences* **61**, 693-699.
- 180. Serraj R, Sinclair TR.** 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions. *Plant, Cell et Environment* **25**, pp333.
- 181. Shabala S, Barbourina O, Newman I.** 2000. Ion specific mechanisms of osmoregulation in bean mesophyll cells. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1243-1253.
- 182. Shinozaki K , Yamaguchi K-Shinozaki K.** 1997. Gène expression and Signal transduction in water sytress response. *Plant physiology*, **115**, 327-334.
- 183. Shinozaki K , Yamaguchi K-Shinozaki K, Liu Q, Kasuga M, Ichimura K, Mizoguchi T, Urao T, Miyata S, Nakashima K, Zabta K S, Abe H, Sakuma Y, Ito T, Seki M.** 1999. Molecular responses to drought stress in plants : regulation of gene expression and signal transduction. In **Smallwood MF, Calvert CM, Bowles DJ.** 1999, chapter 17, eds. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- 184. Shinozaki K , Yamaguchi-Shinozaki K.** 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathway. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 217-223.
- 185. Singh NK, Bracker CA, Hasegawa PM, Handa AK, Bruckel S, Hermodsson MA, Pfankoch E, Regnier FE, Bressan RA.** 1987. Characterization of osmotin. *Plant Physiology* **85**, 529-536.

- 186. Smirnov N.** 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytology* **125**, 27-58.
- 187. Stocker .** 1947. Probleme der pflanzlichen Dürriresistenz. *Natur wissenschaften* **34**, 362-371.
- 188. Tardieu F, Reymond M, Granier C, Hamard H, Muller B.** 2000. Spatial distributions of tissue expansion and cell division rates in maize leaves subjected to water deficit. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1505-1514.
- 189. Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW.** 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* **401**, 914-917.
- 190. Torozer D, Huber SC.** 1997. Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate-synthase in spinach leaves. *Plant Physiology* **114**, 947-955.
- 191. Trémolière A, Hubac C, Guerrier D, Ferrand J.** 1989. Changes of leaf lipid composition during water stress in two genotypes of *Lupinus albus* resistant or susceptible to drought. *Plant Physiology and Biochemistry* **27**, 737-744.
- 192. Troll W, Lindsley J.** 1955. A photometric method for the determination of proline. *Journal Biochemistry* **215**, 655-660.
- 193. Turner NC.** 1986. Crop water deficit : a decade of progress. In : *Advances in Agronomy* **39**, 1-51.
- 194. Tyerman SD, Bonhert HJ, Maurel C, Steudle E, Smith JA.** 1999. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1055-1071.
- 195. Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K.** 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *The Plant Cell* **11**, 1743-1754.
- 196. Van den Ende W, Van Laere A.** 1995. Purification and properties of a neutral invertase from the roots of *Cichorium intybus*. *Plant Physiology* **93**, 241-248.
- 197. Van Heerden PDR, De Villiers OT.** 1996. Evaluation of proline accumulation as an indicator of drought tolerance tolerance in spring wheat cultivars. *South African Journal of Plant and Soil* **13**, 17-23.
- 198. Vassez TL, Sharkey TD.** 1989. Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extracable sucrose phosphate synthase activity. *Plant Physiology* **89**, 1066-1070.
- 199. Velasco R, Salamini F, Bartels D.** 1994. Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* **26**, 541-546.

- 200. Venekamp JH, Koot JTM.** 1988. The sources of free proline and asparagines in field bean plants *vicia faba* L during and after a short period of water with holding. *Journal of Plant Physiology* **132**, 102-109.
- 201. Verslues PE, Sharp RE.** 1999. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiology* **119**, 1349-1360.
- 202. Vierling E.** 1991. The roles of heat shock proteins in plants. Annual Review. *Plant Physiology. Plant. Plant Molecular Biology* **42**, 579-620.
- 203. Vierstra RD.** 1993. Protein degradation in plants. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology* **44**, 385-410.
- 204. Wang X.** 1999. The role of phospholipase D in signaling cascades. *Plant Physiology* **120**, 645-651.
- 205. Weber H, Borisjuk L, Buchner P, Wobus U.** 1995. Seed coat-associated invertases of faba bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell* **7**, 1835-1846.
- 206. Wehmeyer N, Hernandez LD, Finkelstein RR, Vierling E.** 1996. Synthesis of small heat shock proteins in part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiology* **112**, 747-757.
- 207. Weig A, Deswarte C, Chrispeels MJ.** 1997. The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiology* **114**, 1347-1357.
- 208. Weig AR, Jacob C.** 2000. Functional identification of the glycerol permease activity of *Arabidopsis thaliana* NLM1 and NLM2 proteins by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **481**, 293-298.
- 209. Westgate ME, Boyer JS.** 1985. Osmotic adjustment and imbibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* **164**, 540-549.
- 210. Wilkinson RE.** 1989. Terpenoid biosynthesis as a site of action for herbicide safener. *Academic Press. INC*, Chapter 10, 221-240.
- 211. Wilkinson S, Corlett JE, Orger L, Davies WJ.** 1998. Effects of xylem sap PH on transpiration from wild-type and flacca mutant tomato leaves: a vital role for abscisic acid in preventing excessive water loss from well-watered plants. *Plant Physiology* **117**, 703-709.
- 212. Winter H, Huber SC.** 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **19**, 31-67.
- 213. Xin Z, Browse J.** 1998. eskimo 1 mutants of Arabidopsis are constitutively freezing tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**, 7799-7804.

- 214. Yamada S, Komori T, Myers PN, Kuwata S, Kubo T, Imaseki H.** 1997. Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiology* **38**, 1226-1231.
- 215. Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urano S, Shinozaki K.** 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNA clones that encode a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiology* **33**, 217-224.
- 216. Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiology* **38**, 1095-1102.
- 217. Yoshida Y, Nanjo T, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1999. Stress responsive and developmental regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1) gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **261**, 766-772.
- 218. Zadanska B, Wisniewski K.** 1998. ATP-dependent proteolysis contributes to the acclimation-induced drought resistance in Spring wheat. *Acta Physiologiae Plantarum* **20**, 41-48.
- 219. Zeevaert JAD, Creelman RN.** 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 439-474. **Zeiger Z.** 1998. Abscisic Acid (Chapter 23). In *Plant Physiology*, eds. Sinauer, ISBN 0-87893-831-1, University of California, Los Angeles.
- 220. Zeiger Z.** 1998. Abscisic Acid (Chapter 23). In *Plant Physiology*, eds. Sinauer, ISBN 0-87893-831-1, University of California, Los Angeles.
- 221. Zhang CS, Lu Q, Verma DP.** 1997. Characterization of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* subjected to water stress. *Plant Science* **129**, 81-89.
- 222. Zhang L, Ohta A, Takagi M, Imai R.** 2000. Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *Journal of Biochemistry* **127**, 611-616.
- 223. Zrenner R, Schuler K, Sonnewald U.** 1996. Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* **198**, 246-252.
- 224. Zuily-Fodil Y, Vasquez-Tello A, Vieira Da Silva JB.** 1990. Effect of water deficit on cell permeability and chloroplast integrity. *Bulletin Society Botanic Fr* **37**, 15-23.

Composition du milieu KNOP

| | |
|--|---------|
| -Nitrate de Sodium (NO ₃ , Na) | 1g |
| -Nitrate de Potassium (NO ₃ , K) | 0,25 g |
| -Phosphate Mono potassique (PO ₄ , K) | 0,25 g |
| -Sulfate de Magnésium (SO ₄ , Mg) | 0,25 g |
| -Phosphate de fer (PO ₄ , Fe) | Traces. |

Composition du terreau

Support de culture NFU 44.5.51.

Conductivité 750 µs /cm

Matière organique 20 %

Matière sèche 25 %

PH (H₂O) 5,5-6,5

Engrais composés

NPK (14-16-18) avec oligo-éléments 1 kg/m³

Engrais composé organique :

NPK (7-6-6) 1 Kg/m³

Rétention en eau (matière sèche) 450 g /100g

Masse nette 15 kg

FR 19.384553657.00030

Code Activité 516 N

Produit en Hollande

Préparation des réactifs

Préparation du réactif à l'anthrone

A 0,2 g d'anthrone sont rajoutés 100 ml d'acide sulfurique à 91 %.

La préparation se réalise à froid et la solution est conservée à l'abris de la lumière dans la chambre froide.

Préparation du réactif à la Ninhydrine

- 1,25 g de Ninhydrine sont dissous dans :
 - 30 ml d'acide acétique concentré.
 - 7,5 ml d'acide orthophosphorique à 85 %.
- Le tout est complété à 50 ml avec l'eau distillée.

Préparation du réactif de Biorad

- 50 mg de bleu de Coomassie (G250) sont dissous dans :
- 25 ml d'éthanol à 95 %.
- 50 ml d'acide orthophosphorique à 85 %.

Le tout est complété à 500 ml avec de l'eau distillée. Le réactif de Biorad est conservé à l'obscurité dans la chambre froide.