

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté Agro-Vétérinaire

Département des Sciences Agronomiques

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Amélioration des Productions Végétales

EFFET DU STRESS HYDRIQUE SUR LE COMPORTEMENT DE QUELQUES LIGNEES D'ORGE

(Etude des caractéristiques physiologiques biophysiques et
biochimiques chez quelques variétés d'orge (*hordeum. Vulgare*)
vis - à - vis du stress hydrique)

Par

Mohamed Amine MAROK

Devant le jury composé de :

M. SNOUSSI S.A	Maître de conférences. Univ. Blida	Président
Mme.BENREBIHA . F. Z	Maître de conférences. Univ. Blida	Promoteur
M. REY Pascal	Docteur chercheur, CEA, Cadarache, (France)	Co-promoteur
M. BENMOUSSA. M	Maître de conférences. Univ. Blida	Examineur
M. KAMELI Abdelkrim	Professeur. ENS. Kouba.	Examineur
Mme. BOUCHENAK Fatima	Chargé de cours. Univ. Blida.	Membre invité

Blida , Décembre 2005

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté Agro-Vétérinaire

Département des Sciences Agronomiques

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Amélioration des Productions Végétales

EFFET DU STRESS HYDRIQUE SUR LE COMPORTEMENT DE

QUELQUES LIGNEES D'ORGE

(Etude des caractéristiques physiologiques biophysiques et

biochimiques chez quelques variétés d'orge (*hordeum. Vulgare*)

vis - à - vis du stress hydrique)

Par

Mohamed Amine MAROK

Devant le jury composé de :

M. SNOUSSI S.A	Maître de conférences. Univ. Blida	Président
Mme.BENREBIHA . F. Z	Maître de conférences. Univ. Blida	Promoteur
M. REY Pascal	Docteur chercheur, CEA, Cadarache, (France)	Co-promoteur
M. BENMOUSSA. M	Maître de conférences. Univ. Blida	Examineur
M. KAMELI Abdelkrim	Professeur. ENS. Kouba.	Examineur
Mme. BOUCHENAK Fatima	Chargé de cours. Univ. Blida.	Membre invité

Blida , Décembre 2005

الملخص

إن مقاومة النباتات بصفة عامة و الشعير بصفة خاصة للجفاف مترتب عن تعبير هذا الأخير لعدة صفات و خصائص تسمح له بتأقلم وإعطاء مردود مقبول في وسط يشكل فيه الماء عامل محدد.

في هذه الدراسة ركزنا على مقاومة جهاز التركيب الضوئي(الصانعات الخضراء) في حالة تعرض النبتة إلى جفاف ناجم عن إجهاد مائي معتدل . مقاومة النبتة مرهون بوجود ميكانيزمات تسمح لها بالمحافظة على أداء وظيفتها التركيب الضوئي في ضل الجفاف. تم في هذا البحث دراسة مميزات 6 أصناف شعير ذو 6 صفوف. قوة الإحتواء للماء المدروسة أبدت اختلاف بين النبتة الشاهد و النبتة المعرضة لإجهاد مائي, أظهر لنا إختلاف بين الأصناف 6 في حالة نقص الماء وذلك بتميز صنفين .

الدراسة الكيميائية كشفت عن وجود البروتينات (CDSP 32), (BAS1), (MsrB2), (CDSP 34) في الصانعات الخضراء لشعير .

في الأخير قمنا بالبحث عن بروتينيات أخرى تتراكم في الصانعات الخضراء للشعير في حالة جفاف عند صنفين تم اختيارهما، الصنف الأول مقاوم للجفاف و الصنف الثاني حساس للجفاف و ذلك بإستعمال طريقة الإلكترولفوريز ذات بعدين.

بعد المعاينة تم الكشف عن 4 بروتينات متمركزة في حشوة الصانعات الخضراء منها واحدة متواجدة عند الصنفين الحساس و المقاوم أما الثلاثة الأخرين فهم موجودين حسرا في الصنف المقاوم "سعيدة".

كما تم الكشف عن بروتين غشائي له نفس الوزن الجزيئي لـ(CDSP 34) عند الصنفين الحساس و المقاوم.

الكلمات المفتاحية : الإجهاد المؤكسد ; الإجهاد مائي ; بروتينات الصانعات الخضراء ; الشعير ; الصانعات الخضراء.

ABSTRACT

The tolerance of plants to drought in general and more particularly in barley results from the concomitant expression of several adaptative characters allowing the stability of grain yield in environments where water availability is variable.

In this study, we investigated the characteristics of six six-row barley cultivars differing in drought tolerance. We analyzed some biophysical and biochemical parameters related to the resistance of the photosynthetic apparatus. The high tolerance of this metabolism to water deficit conditions suggests the existence of mechanisms protecting chloroplastic structures.

Within the various parameters (Relative Water Content "RWC", photosystem II activity, chlorophyll content, protein content) studied at two developmental stages, a significant difference was only observed for the relative water content. Two varieties maintained a relatively high RWC under water deficit conditions whereas one cultivar showed a great decrease in RWC in the same conditions.

Western blot analysis revealed the presence in barley of the chloroplastic CDSP32, BAS1, MsrB, and CDSP 34 proteins. These proteins are known to participate in stress tolerance in other plant species, but among the six barley varieties studied, no clear correlation was observed between the stress tolerance and the amount of proteins. Finally, we searched other chloroplastic proteins accumulating in response to the lack of water by comparing two varieties of barley, one sensitive "V2" and the other tolerant "Saida".

Using two-dimensional gel electrophoresis and silver nitrate staining, we observed the accumulation of four soluble proteins in plants subjected to water deficit. One of this proteins was revealed in both tolerant and sensitive cultivars whereas the three others were only observed in the tolerant "Saida" variety. Only one membrane protein, likely corresponding to CDSP34, was found to accumulate under water deficit conditions. The three soluble proteins specific to the "Saida" cultivar could participate in its higher drought tolerance.

Keywords : barley ; chloroplast ; chloroplastic proteins ; oxidative stress ; water deficit.

RESUME

La tolérance des plantes à la sécheresse d'une manière générale et particulièrement chez l'orge est l'expression concomitante de plusieurs caractères d'adaptations permettant la stabilité du rendement dans les environnements où les disponibilités en eau sont variables.

Dans cette étude, nous avons étudié les caractéristiques de six cultivars d'orge à six-rangs qui diffèrent dans la tolérance à la sécheresse. Nous avons analysé quelques paramètres biophysiques et biochimiques liés à la tolérance de l'appareil photosynthétique au déficit hydrique. Cette résistance suggère l'existence des mécanismes de protection des structures et des fonctions photosynthétiques.

L'étude des différents paramètres (Contenu Relatif en Eau "CRE", l'activité du photosystème II, la teneur en chlorophylle, la teneur en protéines) pour les deux stades de développement, montre une différence significative entre les variétés sous déficit hydrique pour le paramètre CRE. Deux variétés ont pu maintenir un CRE sous déficit hydrique relativement élevé, tandis qu'une variété a montré une grande diminution du CRE sous les mêmes conditions.

Des immunodétéctions sur membrane nous ont permis d'identifier l'accumulation des protéines chloroplastiques solubles CDSP32, BAS1, MsrB2, et membranaire CDSP34 chez l'orge. Ces protéines sont susceptibles d'intervenir dans des mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique, mais aucune corrélation claire n'a été observée entre la tolérance au déficit hydrique et la quantité de protéines accumulées.

En dernier lieu nous avons entrepris de rechercher d'autres protéines chloroplastiques s'accumulant en réponse au déficit hydrique en comparant deux variétés d'orge, l'une sensible "V2" et l'autre tolérante "Saida".

Sur gels 2-D révélés au nitrate d'argent, nous avons mis en évidence l'accumulation de quatre protéines chloroplastiques solubles. Une de ces protéines a été identifiée chez la variété tolérante et la variété sensible tandis que les trois autres ont été exclusivement observées chez la variété tolérante "Saida". Une seule protéine membranaire a été identifiée s'accumulant lors d'un stress hydrique avec le même poids moléculaire que la CDSP34.

Les trois protéines solubles synthétisées chez la variété "Saida" pourraient donc intervenir dans une plus grande tolérance de ce cultivar face à la sécheresse.

Mots-clés : chloroplaste ;orge ;protéines chloroplastiques ; stress hydrique ;stress oxydant .

Remerciements

Je remercie dieu de m'avoir donné la force de faire ce travaille.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements, ma profonde gratitude

A ma promotrice Madame d'avoir accepté le responsabilité de ce mémoire pour sa participation,, son soutien moral. à Gilles Peltier, directeur du laboratoire de m'avoir accueilli au sein du laboratoire du LEP.

Je suis particulièrement reconnaissante à mon co-promoteur Pascal Rey, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et avoir encadré mon travail avec rigueur, souplesse et disponibilité tout au long de mon stage, et pour la confiance et l'autonomie qu'ils ma accordées,

En ce sens, je tiens à saluer les compétences techniques et la persévérance de Stéphane Cuiné, pour m'avoir initiée a électrophorèse bidimensionnelle, de même, pour les conseil et les encouragement de Geneviève Guedeney "Gégé" (merci pour l'ECL),

Merci aussi à toutes les autres personnes du laboratoire ainsi que les stagiaire, thésard et postdocs que j'ai pu rencontrer au cours de mon séjour (Françoise, Domi, Patrick, Bernard,nicola,...) Pour leur bonne humeur qui ont contribué à créer une bonne ambiance de travail.

Mes sincères remerciements à Mr SNOUSSI qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury

Qu'il me soit également permis de remercier les membres du jury qui ont accepté d'examiner et de juger ce travail M.BENMOUSSA, M.KAMELI, Mme BOUCHENAK.

A Tous ceux qui ont contribué de prés ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers grands-parents.

A mes très chers parents qui m'ont accordé leur aide, leur soutien dont les mots ne sauront décrire.

A mon très cher frère Nacim et ma très chère sœur Saadia.

A toute ma famille.

A tous (tes) mes amis (es) et spécialement ceux qui m'ont offert leur aide et leur soutien inoubliable.

A tous mes professeurs qui ont contribué à ma formation du primaire jusqu'à l'université.

A tous mes camarades de l'université de Blida et spécialement ma promotion d'ingénieur de l'institut d'agronomies.

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
DEDICACE	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET DES TABLEAUX	
INTRODUCTION	18
CHAPITRE 1 : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	<u>19</u>
1.1. GENERALITE SUR L'ORGE	19
1.1.1. Répartition de l'espèce	19
1.1.1.1. Dans le monde	19
1.1.1.2. En Algérie	20
1.2. LA PLANTE, L'EAU ET LE STRESS HYDRIQUE	20
1.2.1. Importance et nécessité de la transpiration	22
1.2.1.1. Croissance et transpiration	23
1.2.1.2. La sécheresse, perception au niveau de la plante	23
1.2.1.3. Les indicateurs de l'état hydrique de la plante	24
1.2.1.3.1. Indicateurs d'état hydrique (type A)	24
1.2.1.3.2. Indicateurs de contrôle d'alimentation hydrique (type B)	25
1.2.1.4. Effets du déficit hydrique au niveau cellulaire	25
1.2.1.4.1. Inhibition de la croissance cellulaire	25
1.2.1.4.2. Accumulation de toxiques et conséquences	26
1.2.1.4.3. Déstabilisation des membranes	27
1.3. L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE FACE AU STRESS HYDRIQUE	27
1.3.1. Chloroplaste et photosynthèse	28
1.3.2. Le rôle de la photosynthèse	29
1.3.3. Les effets du stress hydrique sur la fonction photosynthétique chez les différents types de plantes	32
1.3.3.1. Les plantes de type C3	33
1.3.3.2. Les plantes du type C4	34
1.3.3.3. Les plantes de type Cam (Crassulacean Acid Metabolism)	35

1.4. LES DIFFERENTES FORMES DE REPONSES DES PLANTES	
AU STRESS HYDRIQUE	36
1.4.1. Les mécanismes d'adaptation et de tolérance des plantes face au stress hydrique	36
1.4.1.1. Mécanismes phénologique, physiologique et morphologique	37
1.4.1.1.1. L'esquive	37
1.4.1.1.2. L'évitement	37
A. Contrôle des flux entrants	37
B. Contrôle des flux sortants	38
C. La tolérance	38
1.4.1.2. Mécanismes biochimiques	39
1.4.1.2.1. Les sucres et leurs dérivés, les polyols	39
1.4.1.2.2. Synthèse des molécules aminées (les osmolytes)	39
A. La proline	40
B. Les bétaines	40
1.4.1.2.3. Synthèse de protéines en réponse a une contrainte hydrique	40
A. Les protéines LEA(Late Embryogenesis Abundant)	41
B. Les protéines DSP (Desiccation Stress Proteins)	41
C. Les protéines CDSP (Chloroplastic Drought-Induced Stress Protein)	42
➤ La protéine CDSP32 une thiorédoxine	42
➤ la protéine thyroïdienne CDSP34	44
D. Les aquaporines	45
E. Les inhibiteurs de protéases	45
1.5. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES INDUITS EN	
CONDITION DE STRESS OSMOTIQUE	46
1.5.1. Distribution de l'ABA chez les végétaux supérieurs	46
1.5.1.1. Les voies de régulation des gènes dépendantes de l'ABA	46
1.5.1.2. Les voies de régulation des gènes indépendante de l'ABA	47
1.6. OBJECTIF DU TRAVAIL	48
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	49
2.1. MATERIEL VEGETAL, CONDITIONS DE CULTURE	
ET TRAITEMENTS EXPERIMENTAUX	49

2.1.1. Matériel végétal	49
2.1.2. Conditions de culture	50
2.2. LES MESURES EFFECTUEES	51
2.2.1. Le contenu relatif en eau (CRE)	51
2.2.2. Mesures de la fluorescence chlorophyllienne	52
2.3. LES ANALYSES AFFERENTES A L'ETUDE BIOCHIMIQUE	53
2.3.1. Extraction et dosage des protéines	54
2.3.1.1. Extraction des protéines solubles foliaires	54
2.3.1.2. Extraction des protéines membranaires foliaire	54
2.3.1.3. Dosage des protéines solubles et membranaires pour l'électrophorèse	54
2.3.1.4. Dosage de la chlorophylle	55
2.3.1.5. Dosage des protéines foliaires totales	55
2.3.1.6. Extraction des protéines chloroplastiques	56
2.3.1.6.1. Purification des chloroplastes	56
2.3.1.6.2. Extraction des protéines solubles (S1)	58
2.3.1.6.3. Extraction des protéines membranaires (M)	58
2.3.1.7. Electrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes	58
2.3.1.8. Révélation des protéines par coloration au bleu de Coomassie	60
2.3.1.9. Révélation des protéines par coloration au nitrate d'argent	60
2.3.1.10. Immunodétection sur membrane (Western blot)	60
2.3.1.10.1. Electrotransfert	60
2.3.1.10.2. Immunodétection	61
2.3.1.11. Electrophorèse bidimensionnelle	62

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION 64

3.1. EFFET DU TRAITEMENT HYDRIQUE SUR DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES, BIOPHYSIQUES ET BIOCHIMIQUES	64
3.1.1. Le contenu relatif en eau (CRE)	64
3.1.1.1. Résultats	64
3.1.1.1.1 Analyse de variance	65
3.1.1.1.2 Test de NEWMAN-KEULS $\alpha = 5\%$	66
➤ Facteur Variété	66
➤ Facteur Stade	66
➤ Facteur Stress	67

➤ Interaction Variété-Stress	67
➤ Interaction Stade-Stress	68
3.1.1.2.Discussion	69
3.1.2. Sur la fluorescence chlorophyllienne	70
3.1.2.1.Résultats	70
3.1.2.1.1 Analyse de variance	71
3.1.2.1.2 Test de NEWMAN-KEULS $\alpha = 5\%$	71
➤ Facteur Stade	71
➤ Facteur Stress	72
3.1.2.2.Discussion	72
3.1.3. Sur le taux de chlorophylle	72
3.1.3.1.Résultats	72
3.1.3.1.1 Analyse de variance	73
3.1.3.1.2 Test de NEWMAN-KEULS $\alpha = 5\%$	74
➤ Facteur Variété	74
➤ Facteur Stade	74
➤ Facteur Stress	75
➤ Interaction Stade-Stress	75
3.1.3.2.Discussion	76
3.1.4. Sur le taux de Protéines	76
3.1.4.1.Résultats	76
3.1.4.1.1 Analyse de variance	77
3.1.4.1.2 Test de NEWMAN-KEULS $\alpha = 5\%$	78
➤ Facteur Stade	78
➤ Facteur Stress	78
➤ Interaction Stade-Stress	79
3.1.4.2.Discussion	79
3.1.5. Conclusions	80
3.2. ETUDE DES PROFILS PROTEIQUE ET IMMUNODETECTIONS	81
3.2.1. Etude de la composition protéique foliaire totale	81
3.2.1.1.Effet du déficit hydrique sur la composition protéique soluble	81
3.2.1.2.Effet du déficit hydrique sur a composition protéique membranaire	82

3.2.1.3.Immunodétections avec des anticorps dirigés contre des protéines connues et synthétisées en réponse au stress hydrique	83
3.2.1.3.1 CDSP 32	83
3.2.1.3.2 BAS 1	84
3.2.1.3.3 MsrB2	84
3.2.1.3.4 CDSP 34	85
3.2.2. Discussion	86
3.2.3. Etude de la composition protéique chloroplastique de la variété V2 et V4	89
3.2.3.1.Effet du déficit hydrique sur a composition protéique soluble et membranaire	89
3.2.3.2.Immunodétections des protéines sur membranes	90
3.2.3.2.1 CDSP 32	90
3.2.3.2.2 BAS1	91
3.2.3.2.3 MsrB2	91
3.2.3.2.4 CDSP 34	92
3.2.3.3.Electrophorèse bidimensionnelle	93
3.2.3.3.1 Gels bidimensionnels des protéines solubles (stromales)	93
3.2.3.3.2 Gels bidimensionnels membranaires (thylacoïdiennes)	95
3.2.4. Discussion	96
3.2.5. Conclusions	98
 CONCLUSION GENERALE	 <u>99</u>
 APPENDICE	 <u>101</u>
A : Liste Des Symboles	101
B : Solution Nutritive De Coïc Et Lesaint	103
C : Composition Du Terreau	104
 REFERENCES	 <u>105</u>

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET DES TABLEAUX

- Figure 1.1** : Le cycle de l'eau dans la plante. 21
- Figure 1.2** : Représentation schématique d'un chloroplaste. 29
- Figure 1.3**: Schéma de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons. 30
- Figure 1.4** : Les 3 principales étapes du cycle de calvin ou de la fixation photosynthétique du CO₂ des plantes de type C3. 31
- Figure 1.5**: Sites de génération d'EAO dans la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons. 32
- Figure 1.6** : Cycle photo-respiratoire, ou cycle photo-synthétique d'oxydation du carbone. 34
- Figure 1.7**: Représentation schématique du système chloroplastique ferrédoxine-thiorédoxine. 43
- Figure 1.8** : Modèle proposé par (Broin et al 2002) la réduction des lipides hydroperoxydes thiorédoxine-dépendante dans le chloroplaste. 44
- Figure 1.9**: Voies de transduction du signal entre la perception d'un signal de stress hydrique et l'expression des gènes (d'après Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 1997). 47
- Figure 2.1** : Plantes d'orge arrosés par un système goutte à goutte automatique. 50
- Figure 2.2** : Effet du stress hydrique sur les plants des 6 variétés d'orges après 8 jours sans arrosage au stade tallage. 51
- Figure 2.3** : Représentation schématique de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne dans le PSII. 53

- Figure 2.4** : Les étapes de la séparation des chloroplastes intacts en utilisant un gradient du percoll. 57
- Figure 3.1** : Représentation sous forme d'histogrammes des données concernant le contenu relatif en eau (CRE) entre les plantes témoins et les plantes stressées, après un déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et tallage. 65
- Figure 3.2** : Représentation sous forme d'histogrammes des données de la fluorescence chlorophyllienne entre les plantes témoins et les plantes stressées, après un déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et tallage. 70
- Figure 3.3** : Représentation sous forme d'histogrammes des données concernant le taux de chlorophylle entre les plantes témoins et les plantes stressées, après un déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles. 73
- Figure 3.4** : Représentation sous forme d'histogrammes des données concernant le taux de Protéines totales entre les plantes témoins et les plantes stressées, après un déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et tallage. 77
- Figure 3.5** : Profils SDS-PAGE révélés au bleu de Coomassie de protéines foliaires solubles de plantes d'orge *Hordeum vulgare* témoins et soumises à un déficit hydrique de 8 jours au stade tallage. 81
- Figure 3.6** : Profils SDS-PAGE révélés au bleu de Coomassie de protéines foliaires membranaires de plantes d'orge *Hordeum vulgare* témoins et soumises à un déficit hydrique de 8 jours au stade tallage. 82
- Figure 3.7** : Analyse western des protéines membranaires des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP32, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline. 83
- Figure 3.8** : Analyse western des protéines solubles des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre BAS1, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline. 84

- Figure 3.9:** Analyse western des protéines Solubles des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre MSRB, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline. 84
- Figure 3.10 :** Analyse western des protéines membranaires des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre MSRB, en utilisant une révélation à la peroxydase. 85
- Figure 3.11 :** Analyse western des protéines membranaires des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP 34, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline. 85
- Figure 3.12:** Analyse western des protéines membranaires des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP 34, en utilisant une révélation à la peroxydase. 86
- Figure 3.13 :** Profils SDS-PAGE révélés au bleu de Coomassie de protéines chloroplastiques solubles et membranaires d'orge au stade 4 feuilles de plants témoins (T) et soumises à un déficit hydrique de 8 jours (S). 89
- Figure 3.14 :** Analyse western des protéines chloroplastiques solubles de deux variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP 32, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline. 90
- Figure 3.15 :** Analyse western des protéines chloroplastiques solubles de deux variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP 34, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline. 91
- Figure 3.16 :** Analyse western des protéines chloroplastiques solubles de deux variétés d'orge avec le sérum dirigé contre MSRB, en utilisant une révélation à la phosphatase. 91
- Figure 3.17 :** Analyse western des protéines chloroplastiques solubles de deux variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP 34, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline. 92
- Figure 3.18 :** Electrophorèses 2-D de protéines chloroplastiques solubles révélées au nitrate d'argent avec 15µg de protéines par gel. 94

Figure 3.19 : Electrophorèses 2-D de protéines chloroplastiques solubles révélées au nitrate d'argent avec 15 µg de protéines par gel.	94
Figure 3.20: Electrophorèses 2-D de protéines chloroplastiques membranaires révélées au nitrate d'argent avec 15µg de protéines par gel.	95
Figure 3.21: Electrophorèses 2-D de protéines chloroplastiques membranaires révélées au nitrate d'argent avec 15µg de protéines par gel.	95
Tableau 2.1 : Composition du tampon d'extraction des protéines foliaires solubles	54
Tableau 2.2 : Composition du tampon de resuspension des protéines foliaires membranaire.	54
Tableau 2.3 : Composition du milieu A.	57
Tableau 2.4 : Composition du tampon de stockage hypotonique des chloroplastes.	57
Tableau 2.5 : Composition du tampon d'extraction des protéines solubles (S).	58
Tableau 2.6 : Composition du tampon d'extraction des protéines membranaires (M).	58
Tableau 2.7 : Composition du gel de concentration d'acrylamide à 5% (m/v) (pour 4gels).	59
Tableau 2.8 : Composition du gel de séparation d'acrylamide à 13% (m/v) (pour4 gels).	59
Tableau 2.9 : Composition du milieu Réhydratation Concentration (1x) pour un volume de 25ml.	62
Tableau 2.10 : Composition du milieu LDS Concentration (4X).	63
Tableau 2.11 : Composition du milieu MOPS SDS.	63

Tableau 3.1 : Contenu relatif en eau (CRE) pour les 6 variétés d'orge stressées et témoins, avec une application du déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et stade tallage.	64
Tableau 3.2 : Analyse de la variance de la variable le contenu relatif en eau (CRE).	65
Tableau 3.3 : Moyennes et groupes homogènes du facteur variété pour la variable, contenu relatif en eau (CRE).	66
Tableau 3.4 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stade de développement pour la variable contenu relatif en eau (CRE).	67
Tableau 3.5 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stress pour la variable le contenu relatif en eau (CRE).	67
Tableau 3.6 : Moyenne et groupes homogènes de l'interaction entre le facteur variété et le facteur stress pour la variable, contenu relatif en eau (CRE).	68
Tableau 3.7 : Moyennes et groupes homogènes de l'interaction entre le facteur stade de développement et le facteur stress pour la variable contenu relatif en eau.	68
Tableau 3.8 : Fluorescence chlorophyllienne mesurée pour les 6 variétés d'orge stressées et témoins, avec application du déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et stade tallage.	70
Tableau 3.9 : Analyse de la variance de la variable la fluorescence chlorophyllienne.	71
Tableau 3.10 : Moyennes et groupes homogènes du facteur Stade de développement pour la variable fluorescence chlorophyllienne (Fv/Fm).	71
Tableau 3.11 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stress pour la variable la fluorescence chlorophyllienne (Fv/Fm).	72

Tableau 3.12 : Taux de chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$) pour les 6 variétés d'orge stressées et témoins, avec une application du déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et stade tallage.	73
Tableau 3.13 : Analyse de la variance de la variable, le taux de chlorophylle.	74
Tableau 3.14 : Moyennes et groupes homogènes du facteur variété pour la variable, le taux de chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).	74
Tableau 3.15 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stade de développement pour la variable le taux de chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).	75
Tableau 3.16 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stress pour la variable le taux de chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).	75
Tableau 3.17 : Moyennes et groupes homogènes de l'interaction entre le facteur stade de développement et le facteur stress pour la variable, le taux de chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).	76
Tableau 3.18 : Le taux de Protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche) pour les 6 variétés d'orge stressées et témoins, avec une application du déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et stade tallage.	77
Tableau 3.19 : Analyse de la variance de la variable, le taux de Protéines totales.	78
Tableau 3.20 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stade de développement pour la variable le taux de Protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).	78
Tableau 3.21 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stress pour la variable le taux de Protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).	79
Tableau 3.22 : Moyennes et groupes homogènes de l'interaction entre le facteur stade de développement et le facteur stress pour la variable le taux de Protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).	79

INTRODUCTION

Le manque d'eau dû à un climat connu pour ces précipitations erratiques et imprévisibles, figure parmi les contraintes majeures qui affectent la production des céréales dans le bassin méditerranéen [1]. En Algérie, la presque totalité des surfaces cultivées en orge sont localisées sur les hautes terres semi-arides où les possibilités d'intensification sont très réduites, la pluviométrie et les températures y sont sujettes à de grandes variations intra et inter annuelles, qui affectent sérieusement les rendements des cultures [2]. La culture de l'orge joue un rôle important dans l'équilibre économique des petites exploitations des zones marginales, il reste l'aliment majeur dans l'alimentation humaine et animale [3]; [4]. L'orge est une espèce de choix. Elle présente des capacités d'adaptation à plusieurs stress abiotiques. Certaines variétés locales représentent une large source de variation pour des caractères morpho-physiologiques susceptibles de contribuer à la stabilité du rendement. L'utilisation de variétés locales est presque de règle et l'adoption de nouvelles variétés est conditionnée par la stabilité de leur production [5]; [6]. La sélection variétale est pratiquée sur la base du rendement, dans ces environnements caractérisés par le stress hydrique. Les sélectionneurs éprouvent des difficultés pour établir des programmes de sélection pour l'amélioration vis-à-vis de la sécheresse, ceci s'explique par le fait que le rendement est un caractère quantitatif complexe très variable soumis à des interactions génotype-milieu fortes avec un coefficient d'héritabilité plutôt faible. Le recours à l'utilisation d'autres méthodes, en parallèle, pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'adaptation des plantes pourrait faciliter l'amélioration de la tolérance au stress car la résistance au stress est la somme des réponses du végétal exprimées selon différents niveaux d'organisation [7].

L'étude des effets du déficit hydrique sur la photosynthèse et sur le compartiment chloroplastique vise à obtenir une meilleure compréhension des mécanismes de protection de la fonction photosynthétique. Cette étude sera menée notamment par une approche biochimique pour analyser l'abondance de certaines protéines pouvant jouer un rôle protecteur dans le chloroplaste.

CHAPITRE I

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 GENERALITE SUR L'ORGE :

L'orge cultivée (*Hordeum.vulgare*), généralement diploïde ($2n = 2x = 14$) et autogame, elle est aussi ancienne que les origines de l'agriculture elle-même. Elle est issue des formes sauvages d'*Hordeum.spontaneum* que l'on trouve encore aujourd'hui au proche et moyen – orient. Elle se présente sous des formes à épis à deux ou six rangs [4] .

L'orge est plus précoce que le blé sa levée plus rapide que celle du blé, et un peu moins résistante au froid [4];[8] .

1.1.1 Répartition de l'espèce :

1.1.1.1 Dans le monde :

C'est la céréale, dont la distribution apparaît naturellement la plus vaste du fait de sa précocité, de son potentiel de productivité en zones arides-tropicales- voire salées, ou d'altitude, et en raison de sa rusticité [4] .

Les céréales y sont bien adaptées du fait de leur grande souplesse par rapport aux conditions pédoclimatiques. Elles y sont cultivées depuis l'antiquité (pour l'orge et le blé dur) [9].

L'orge est cultivée principalement dans les zones arides, au sud des pays, du fait de sa résistance à la sécheresse. Elle est plus tolérante que les autres céréales, est souvent cultivée dans des conditions climatiques les plus difficiles (200-250mm/an) [10].

C'est une culture des pays tempérés, mais elle peut tolérer aussi bien les températures élevées si l'humidité est basse, que des situations d'altitude des tropiques de la zone arctique [4] .

1.1.1.2 En Algérie :

En Algérie, Le régime pluviométrique est la contrainte essentielle de la céréaliculture. En effet, la majorité des céréales sont cultivées en culture pluviale, sans recours à l'irrigation, dans des étages climatiques arides et semi-arides caractérisés par une hauteur moyenne des précipitations faibles 200 à 600 mm. L'isohyète de 300 mm sépare les deux étages ;

- une saison pluvieuse située en hiver allant d'octobre à mars ;
- une sécheresse estivale de 3 à 6 mois.

Ces zones sont caractérisées par un déficit pluviométrique structurel par rapport aux besoins en eau de la végétation et par une très forte variabilité, inter -annuelle et intra-annuelle, des pluies. De plus, les accidents climatiques y sont très fréquents et destructeurs : vents chauds (sirocco), gel, grêle et même inondations [9].

Les besoins globaux en eau sont donc estimés entre 450 et 500 mm, pour produire 40 quintaux. Malgré ces besoins relativement importants, signalons que les prélèvements en fin de végétation sont limités. Cette donnée va permettre de cultiver cette céréale dans les régions relativement sèches [8].

Les études fréquentielles du climat ont permis d'identifier deux périodes principales de sécheresse. La première arrive à l'automne, elle est répartie du semis jusqu'au tallage. La seconde coïncide avec le remplissage du grain [1]; [11].

La quasi –totalité de l'orge est cultivée sans aucune irrigation [12].

En Algérie, l'orge reste encore un aliment important pour de larges franges de populations humaines, notamment dans les zones semi-arides chaudes [4].

1.2 LA PLANTE , L'EAU ET LE STRESS HYDRIQUE :

L'eau est la ressource naturelle qui limite le plus les rendements en agriculture [13]; [14].

Une diminution de la teneur en eau de la plante se traduit immédiatement par une réduction de la croissance en dimension, avant même que la photosynthèse ne soit affectée [15].

L'importance écologique de l'eau est liée à son rôle. L'eau est le constituant pondéral le plus important des végétaux (50 % à 90 % de leur masse de matière fraîche). Elle est le milieu dans lequel a lieu la quasi-totalité des actions chimiques et elle joue le rôle de solvant, de substrat et de catalyseur. Par la pression qu'elle exerce sur les parois, l'eau

permet la turgescence cellulaire indispensable au port érigé des plantes herbacées, à l'expansion cellulaire dans les tissus en croissance. La turgescence est également à la base des mouvements d'organes (feuilles, étamines) et de cellules (stomates). A l'échelle de l'organisme, l'eau permet de véhiculer les substances nutritives, les déchets du catabolisme et les phytohormones (Figure 1.1).

L'eau est donc impliquée tant, dans les structures que dans les processus de transport et du métabolisme des plantes.

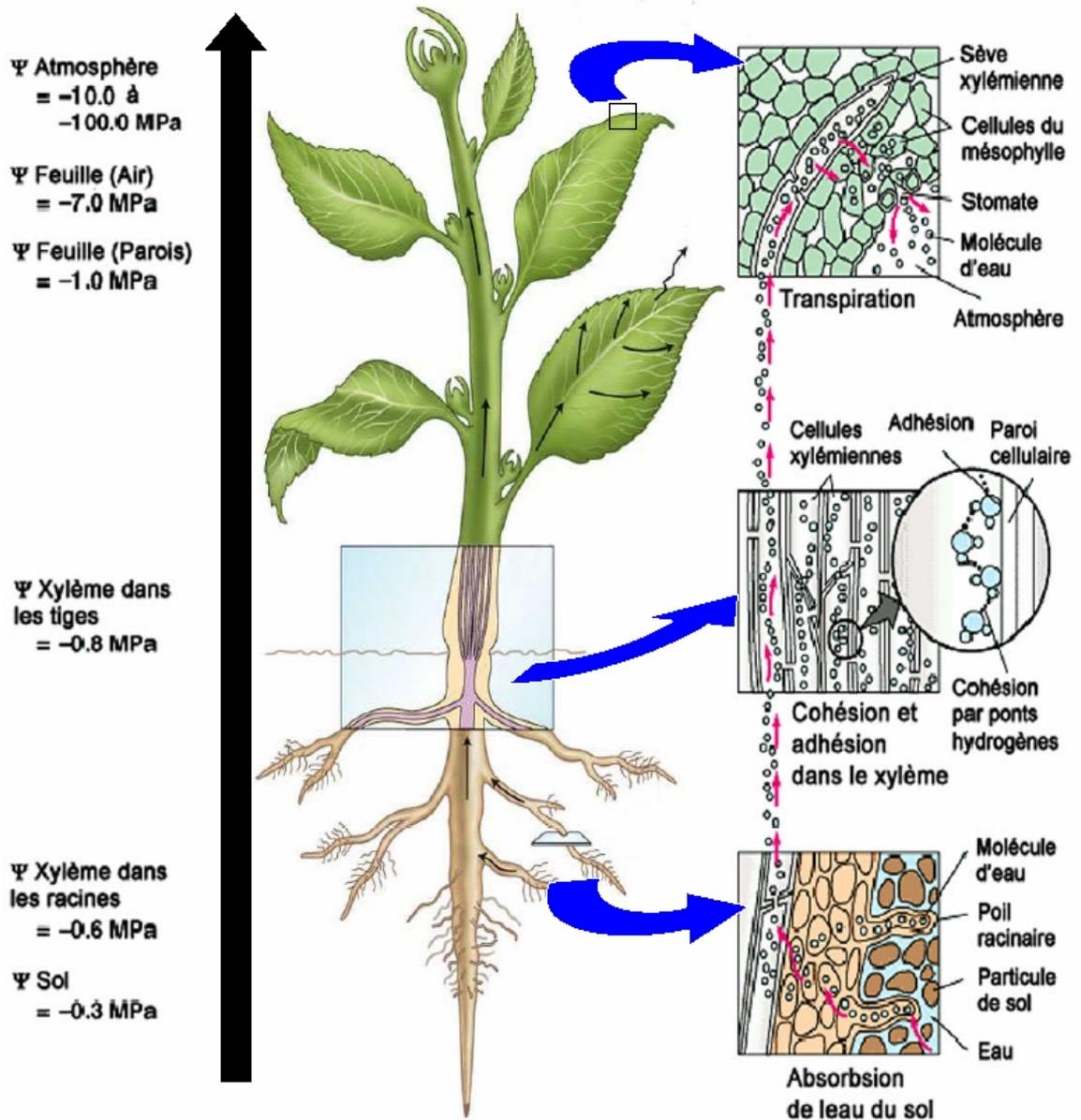


Figure 1.1 : Le cycle de l'eau dans la plante.

1.2.1 Importance et nécessité de la transpiration :

Les plantes sont à l'interface entre deux milieux - le sol et l'atmosphère - avec lesquels elles entretiennent des échanges de matière et d'énergie. D'un point de vue hydrique la plante constitue un maillon de continuum sol - plante - atmosphère dans lequel s'effectue divers processus de transfert, de matière plus au moins interdépendants. La transpiration, qui est définie comme la perte d'eau à l'état de vapeur par les feuilles, correspond d'un point de vue physique à une évaporation. La transpiration exige donc un apport d'énergie fourni essentiellement par le rayonnement incident. La transpiration dépend, en outre, de la température et de l'hygrométrie de l'air, de la forme et de la disposition des feuilles, des résistances à la diffusion des gaz opposée par les stomates et par la couche limite d'air (fonction du vent) qui entoure les feuilles [16].

La transpiration est le processus majeur des relations hydriques de la plante, par son importance quantitative et en conséquence par son rôle majeur dans la détermination de l'état hydrique de la plante. Au cours d'une belle journée d'été, un pied de maïs peut perdre 50 % de son poids d'eau en 24 heures. L'évaporation de l'eau crée un gradient de potentiel chimique qui est le moteur des mouvements d'eau dans la plante. La transpiration permet également aux plantes de dissiper, sous forme de chaleur latente, une partie de l'énergie qu'elle reçoivent et limite ainsi leur échauffement [17].

La transpiration est souvent considérée comme un **mal inévitable** ; un mal par son action de déshydratation de la plante, inévitable du fait de la structure des feuilles et de la nécessité vitale pour la plante des échanges gazeux. Il existe une forte dualité entre la transpiration et la photosynthèse, le dioxyde de carbone CO_2 et l'eau empruntant le même trajet. L'augmentation de la conductivité liée à l'ouverture stomatique, augmente donc potentiellement le taux de photosynthèse et de transpiration. Mais le bénéfice photosynthétique, d'une augmentation de la diffusion du CO_2 dans la feuille, est contrebalancé par le coût de l'augmentation concomitante à la transpiration, ce coût de la transpiration peut inclure une diminution de la capacité photosynthétique du mésophylle due à une diminution du potentiel hydrique foliaire.

Le rapport entre le taux de transpiration et le taux d'assimilation du CO_2 , défini aux échelles de la feuille, il nous donne l'efficacité d'utilisation de l'eau (EUE). Cette dernière est un paramètre écologique important et utile, qui détermine, une partie au moins, des caractéristiques de l'adaptation des plantes à la sécheresse [18].

1.2.1.1 Croissance et transpiration :

La croissance en volume d'un organe résulte essentiellement de l'expansion cellulaire. L'agrandissement cellulaire et l'alimentation hydriques sont fortement couplés, puisque l'accroissement de volume d'une cellule est avant tout en proportionnel à un accroissement de volume d'eau. Cependant la quantité d'eau destinée à la croissance est souvent très faible comparée aux flux d'eau transpiré, environ 1 % [19];[20].

À l'échelle de la plante, les interactions entre la transpiration et la croissance sont multiples et complexes. Toutefois, de manière globale, toute régulation du fonctionnement de la plante ayant pour effet de réduire la transpiration -- à température constante -- est accompagné d'une augmentation de la vitesse de croissance foliaire et, *vice versa* [21]. Si beaucoup d'études ont mis en évidence le couplage entre la transpiration et la croissance foliaire, très peu se sont penchés sur les mécanismes de cette interaction. L'eau destinée à la croissance doit, a priori, provenir de la même source -- le xylème -- que l'eau de la transpiration. Lorsque la transpiration augmente, la diminution du potentiel hydrique du xylème réduit la disponibilité en eau pour la croissance des parties aériennes. La croissance et la transpiration apparaissent donc comme deux processus consommateurs d'eau potentiellement en compétition. La disponibilité de l'eau est un élément important de l'interaction entre la croissance et la transpiration. Cependant des régulations d'ordre biologique doivent également être prises en compte (extensibilité des parois, disponibilité en solutés, variations de la perméabilité) [22].

Les études menées jusqu'à présent ne permettent pas de relier dans un cadre conceptuel cohérent les différents flux d'eau de la plante, la pression de turgescence et le comportement bio-rhéologique des tissus en croissance. Les techniques d'étude des relations hydriques progressent, allant à une échelle toujours plus fine, mais nous avons de plus en plus de difficultés à relier les comportements et les mécanismes que nous observons à l'échelle de l'organe et de la cellule au comportement de la plante entière et plus encore s'il s'agit d'intégrer ces mécanismes à l'échelle du peuplement [23]; [24].

1.2.1.2 La sécheresse, perception au niveau de la plante :

Avant de parler sur les effets des facteurs du stress hydrique il convient de définir certains termes. Contrairement à une idée répandue, la sécheresse n'est pas simplement synonyme de faibles précipitations.

Selon [25] Le mot "sécheresse" se situe sur une chaîne de causalités sur laquelle il convient de définir sa place exacte afin de ne pas le considérer tantôt comme cause et tantôt comme effet.

[26] a défini une sécheresse météorologique, laps de temps pendant lequel il ne tombe aucune pluie si faible qu'elle soit.

Cette absence de pluie a une incidence sur d'autres domaines. En agriculture la sécheresse est définie par une période climatique suffisamment sèche et prolongée qui provoque des dommages aux plantes et une pénurie de l'approvisionnement en eau. Elle est fondée sur un déficit de transpiration anormal. Dans ce cas, la balance est déficitaire entre, d'une part, la consommation d'eau par la plante, et d'autre part, la fourniture par le sol. C'est l'une des difficultés pour analyser et prévoir les régulations de la plante précises et mesurables [27] ; [28].

Selon son apparition dans le temps, la sécheresse affecte d'une manière différenciée le végétal durant les différents stades de développement [28].

La sécheresse n'est pas un phénomène isolé et isolable de ses effets, en milieu naturel la sécheresse est souvent associée à un déficit hydrique ou à une augmentation de température.

Selon [29], le stress hydrique peut être la conséquence de plusieurs facteurs abiotiques.

1.2.1.3 Les indicateurs de l'état hydrique de la plante :

Pour Contrôler l'état hydrique de la plante on est amené à se référer à deux types d'indicateurs [30], désignés par A et B.

1.2.1.3.1 Indicateurs d'état hydrique (type A) :

Ce sont des indicateurs qui caractérisent directement ou indirectement l'état hydrique du couvert végétal soit :

➤ En exprimant l'état hydrique de la plante. C'est le cas de la teneur en eau des feuilles (TRE), ou le potentiel hydrique (PF) et osmotique (PO). Selon [31] la (TRE) est le meilleur indicateur de l'état hydrique de la plante, qui est également un caractère polygénique qui présente une forte héritabilité quand la plante est soumise au stress hydrique [32] ; [33]. Le second caractère est le potentiel osmotique foliaire (PO), qui est également un des mécanismes qui permet le maintien de l'état hydrique de la plante en condition de sécheresse [32] ; [34].

➤ En traduisant la modification de la conductance stomatique, les températures foliaires, les variations de diamètres des organes végétaux, les symptômes visuels et les vibrations sonores [35].

➤ En exprimant le rapport évapotranspiration réelle et potentielle ETR/ETP ou de l'évapotranspiration réelle et maximale ETR/ETM. Ces mesures permettent d'apprécier sur un laps de temps dans quelle mesure les besoins en eau de la culture ont été satisfaits [35].

1.2.1.3.2 Indicateurs de contrôle d'alimentation hydrique (type B) :

Ce sont ceux qui caractérisent le milieu ou encore certaines propriétés physiques ou anatomiques du végétal, conditionnant l'équilibre hydrique de la plante, le stock d'eau disponible, le potentiel hydrique du sol, cette approche consiste à définir une réserve utile du sol et à restaurer cette réserve [35].

1.2.1.4 Effets du déficit hydrique au niveau cellulaire :

Le manque d'eau pour la plante entraîne une déshydratation au niveau de la cellule. Selon [36] il y a deux niveaux d'hydratation de la cellule végétale en relation avec l'intensité d'un déficit hydrique. Lorsque la plante est soumise à un déficit modéré (diminution du contenu relatif en eau (CRE) inférieure à 20%), la cellule végétale demeure turgescente et les processus métaboliques sont peu inhibés. Par contre, lors d'une contrainte hydrique intense (perte de plus de 20% du CRE de la plante), il y a déshydratation de la cellule et plasmolyse, qui se traduit par un flétrissement des tissus végétaux. Les processus métaboliques sont alors fortement inhibés.

1.2.1.4.1 Inhibition de la croissance cellulaire :

Le manque d'eau dans l'environnement entraîne rapidement un ralentissement de la croissance des cellules de la plante. En effet, la croissance cellulaire est un processus dépendant de la turgescence, c'est-à-dire de la pression exercée par l'eau dans la cellule. Comme le déficit hydrique entraîne une diminution de la turgescence, il provoque aussi une inhibition des mécanismes de division, d'élongation et de différenciation cellulaire, notamment au niveau du système foliaire [29];[37].

Chez le blé en condition de stress modéré, l'élongation foliaire est rapidement limitée et l'activité mitotique des cellules mésophylliennes se trouve réduite de 42% [38].

Ces auteurs montrent également que l'activité de la CDC2 (Cell-Division-Cycle) kinase, une enzyme intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire, diminue en réponse à une limitation hydrique.

1.2.1.4.2 Accumulation de toxiques et conséquences :

La déshydratation cellulaire entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en sels et divers composés toxiques. Les anions bivalents (sulfate et phosphate) à des concentrations élevées agissent directement au niveau des sites actifs de certaines enzymes et perturbent leur activité [39]. Une telle inhibition est mise en évidence pour de nombreuses enzymes-clés du métabolisme telles que la Rubisco [40], la saccharose phosphate synthase [41] ou la phosphoenolpyruvate carboxylase [42].

Des fortes concentrations intracellulaires en ions peuvent causer des modifications de certains acides aminés (acide aspartique, asparagine) par des réactions spontanées telles que des désamidations, racémisations ou isomérisations [43]. Ces modifications provoquent au niveau des protéines des perturbations conformationnelles entraînant une diminution de l'activité catalytique dans le cas d'enzymes, ou des modifications fonctionnelles dans le cas de protéines de structure. Enfin, lors d'un déficit hydrique, l'activité protéolytique augmente sensiblement [44], contribuant à la dégradation des protéines endommagées, mais aussi des protéines intactes.

Les espèces activées de l'oxygène (EAO) qui sont formées en plus grande quantité en condition de stress, notamment au niveau du compartiment chloroplastique, sont susceptibles de réagir avec différentes macromolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) et avoir des actions délétères [45]. Les modifications oxydatives se produisant sur l'ensemble des acides aminés peuvent être réversibles ou irréversibles [46] ;[47].

L'oxydation réversible des groupes sulfhydryles SH des résidus méthionine et cystéine des protéines conduit à la formation de groupements de types disulfide, sulfénate et sulfonate.

Dans le cas d'oxydations irréversible, on peut observer la rupture des chaînes polypeptides et la formation de dérivés carbonyles et amides [46]. Ces dommages oxydatifs sur les protéines entraînent des changements conformationnels, des pertes d'activité enzymatique et une augmentation de la sensibilité à la protéolyse. Par ailleurs, l'une des cibles de EAO sont les lipides dont l'oxydation (peroxydation) correspond à l'incorporation d'oxygène moléculaire dans les acides gras polyinsaturés. L'ADN paraît

être également très sensible aux EAO qui causent des altérations dans les bases, les sucres et les liaisons phosphodiester entre les nucléotides [48]. Les conséquences de telles lésions sont souvent mutagènes. De plus, lors d'un déficit hydrique intense, la synthèse des protéines est inhibée en raison de la diminution de la synthèse des acides nucléiques et de l'augmentation de l'activité ARNase [37].

1.2.1.4.3 Déstabilisation des membranes :

En condition de déficit hydrique, de nombreuses perturbations structurales apparaissent au niveau de la paroi cellulaire et des membranes plasmiques, du noyau et des organites subcellulaires (mitochondrie, plaste). Dans un premier temps, ces perturbations résultent d'une contrainte physique. En effet, si les pertes d'eau de la cellule sont rapides et conduisent à la plasmolyse, des phénomènes de distorsion des membranes se produisent. Une réponse adaptative de la cellule lors d'un stress pour limiter ces phénomènes de distorsion est l'augmentation de la synthèse de lignine [49], réduisant par la même occasion l'extension des parois cellulaires. Dans des conditions de déficit hydrique intense, la composition en lipides totaux est modifiée [50], en particulier celle des membranes plasmique et thylacoïdienne [51] ; [52] ; [53]. Ces modifications perturbent les propriétés physico-chimiques des membranes, créent des changements de fluidité et de perméabilité tout en affectant le fonctionnement des protéines associées aux membranes (canaux ioniques, enzymes membranaires). En condition de stress extrême, une déstabilisation très marquée des membranes est observée, elles perdent alors leurs fonctions de barrière et d'échange [54].

1.3 L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE FACE AU STRESS HYDRIQUE :

La diminution de la photosynthèse, liée à la diminution de la teneur relative en eau et du potentiel hydrique foliaire, est due essentiellement, à la réduction de la pénétration du CO₂, limitée par une fermeture des stomates, avec pour conséquence une augmentation de la résistance de la feuille à la diffusion du CO₂ [55].

La nature et l'étendue des effets du manque d'eau sur la plante sont fonction de l'intensité et de la durée du stress, aussi bien que des capacités génétiques des espèces à résister aux contraintes environnementales. Il est maintenant bien établi que l'assimilation nette de CO₂ diminue dans les feuilles de plantes soumises à un déficit hydrique modéré [56].

Les capacités photosynthétiques ne sont affectées qu'en condition de déficit hydrique intense [57] , de plus, des plantes soumises à une période de manque d'eau présentent une thermotolérance accrue au niveau du fonctionnement du photosystème II [58]. En état de stress, c'est l'efficacité du système photochimique de la feuille qui est mise en jeu [59].

1.3.1 Chloroplaste et photosynthèse :

Les organismes photosynthétiques se caractérisent par leur capacité à utiliser l'énergie solaire pour synthétiser de la matière organique, au cours d'un processus biochimique appelé photosynthèse. Chez les végétaux supérieurs, la photosynthèse se déroule au sein d'un organite spécialisé, propre aux cellules végétales qui est le chloroplaste (Figure 1.2). Il est communément admis que le chloroplaste des plantes supérieures dérive d'un hôte procaryotique endosymbiotique, dont le plus proche organisme actuel serait la cyanobactérie [60]. Chez les eucaryotes photosynthétiques, les différentes étapes de la photosynthèse se déroulent au sein du chloroplaste. Cet organite, semi-autonome sur le plan génétique, est délimité par une enveloppe externe et une enveloppe interne, comprenant une matrice granulaire : le stroma. Baignant dans la matrice stromatique, deux structures membranaires sont présentes : les thylacoïdes granaires ou grana lamellae, empilement de saccules, et les thylacoïdes lamellaires ou stroma lamellae, formant des connexions entre les structures granaires [61] ; [37]. Les membranes thylakoïdiennes, internes au chloroplaste, contiennent les pigments photosynthétiques responsables de la capture de l'énergie lumineuse et les protéines nécessaires à sa conversion en énergie chimique. Ces membranes délimitent un espace interne appelé lumen.

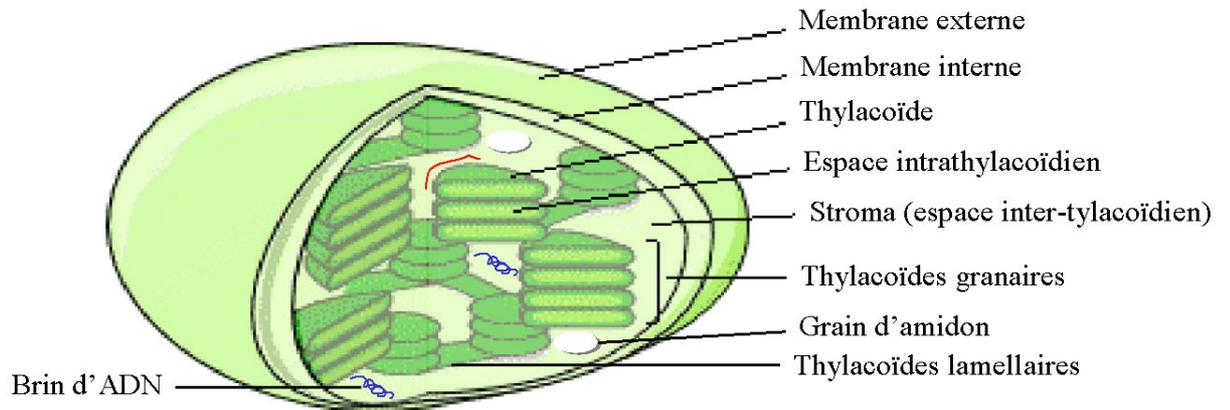


Figure 1.2 : Représentation schématique d'un chloroplaste

1.3.2 Le rôle de la photosynthèse :

La photosynthèse est le processus permettant aux végétaux supérieurs chlorophylliens de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique à pouvoir phosphorylant (ATP) ou réducteur (NADPH), puis d'utiliser cette énergie pour réduire le CO_2 atmosphérique sous forme de substrats hydrocarbonés afin de l'assimiler (Figure 1.3). L'énergie produite lors de la **phase photochimique (claire)** va permettre des réactions de synthèse de molécules organiques d'avoir lieu. Ces réactions constituent le **cycle de Calvin**, (Figure 1.4). Nommé ainsi en l'honneur de son découvreur, Melvin Calvin, prix Nobel de chimie 1961. On parle de **phase d'assimilation (obscur)** pour indiquer que ces réactions n'ont pas besoin de lumière pour être effectuées. Il est à noter que la lumière peut aussi influencer ces mêmes réactions [62].

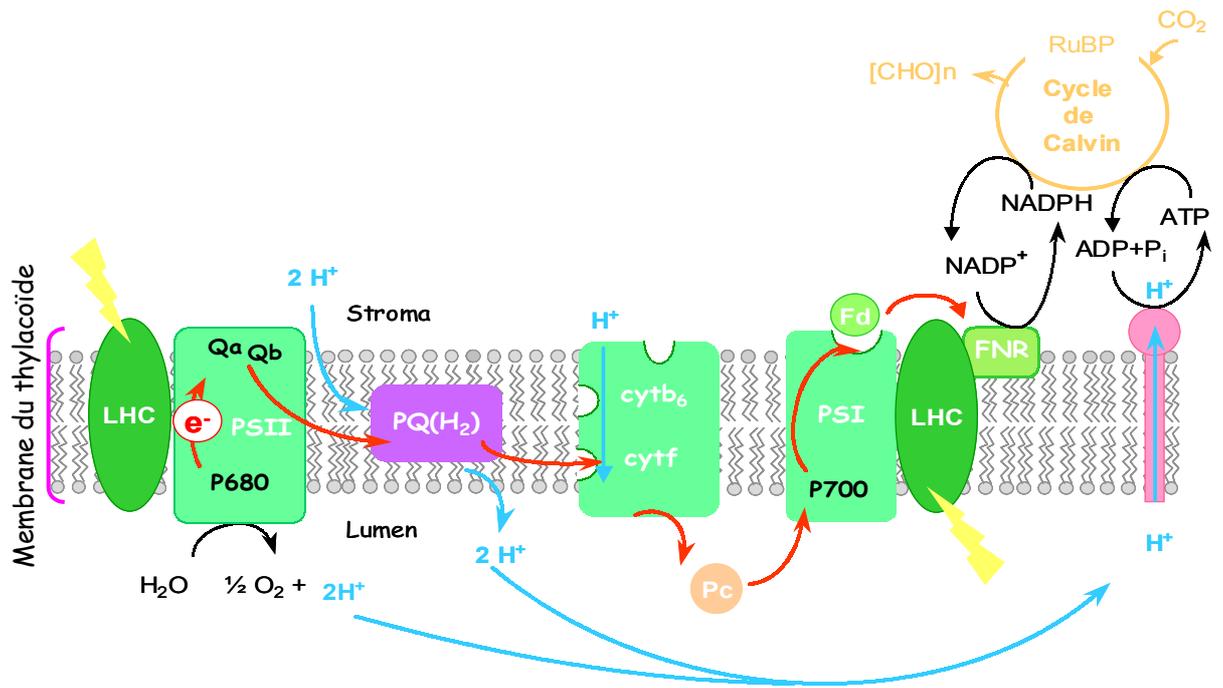


Figure 1.3: Schéma de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons.

L'absorption d'énergie lumineuse par le centre réactionnel du PSII initie la photolyse de l'eau et le transfert des électrons de l'eau à l'accepteur final, le NADP⁺ (→). Le transport des électrons par les plastoquinones (PQ) est associé à une translocation de protons à travers la membrane thylakoidienne. La force proto-motrice liée au gradient transmembranaire de protons est utilisée pour la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (→).

PS: photosystème, PQ: plastoquinone, Q: quinone, Pc :plastocyanine, cyt: cytochrome, Fd: ferrédoxine, FNR: ferrédoxine-NADP réductase, LHC :antennes collectrices (Light Harvesting Complexe)

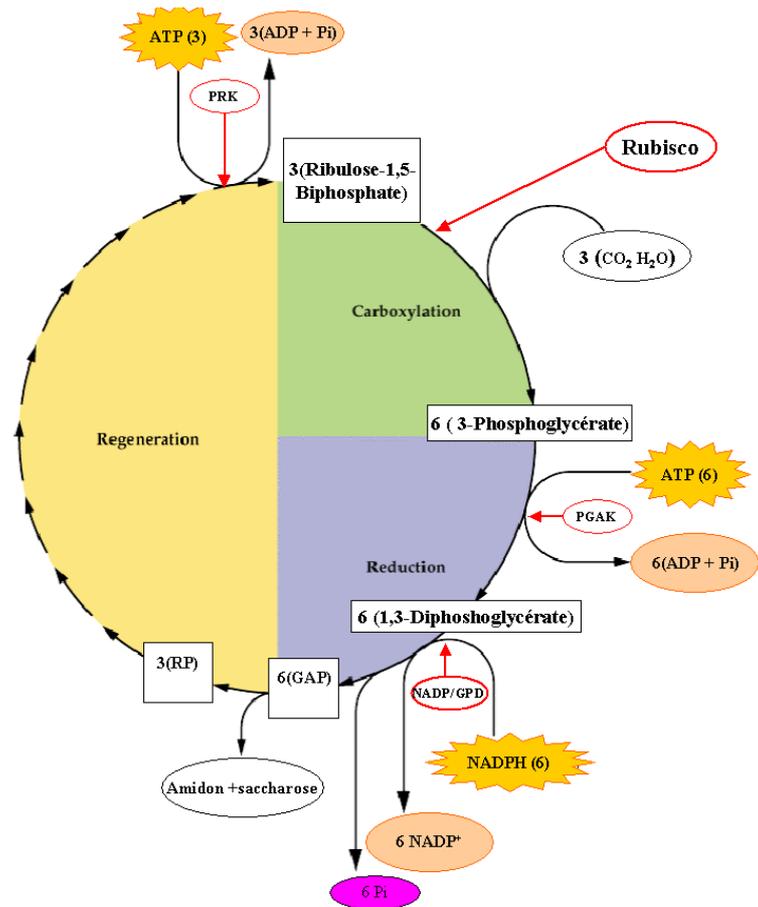


Figure 1.4 : Les 3 principales étapes du cycle de calvin ou de la fixation photosynthétique du CO_2 des plantes de type C3.

Rubisco : Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase oxygénase

PGAK : 3-phosphoglycérate Kinase ;

NADP/GPD: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

6(GAP) : 6 Glycéraldéhyde 3 phosphate

3(RP) : 3 Ribulose 5-phosphate

PRK ; Phosporibulo kinase

1.3.3 Les effets du stress hydrique sur la fonction photosynthétique chez les différents types de plantes :

Un déficit hydrique qui se traduit par une CRE inférieur à 70% entraîne des effets fonctionnels sur les capacités photosynthétiques, non seulement du fait de la limitation en CO_2 qui se traduit par un déséquilibre entre la production de pouvoir réducteur, mais aussi du fait de la déshydratation cellulaire [63]. Ces effets seraient principalement dus à l'accumulation passive dans le stroma d'ions inorganiques, au cours de la rétraction de la cellule en condition de déshydratation [39].

Cette inhibition reste réversible jusqu'à un CRE de l'ordre de 40%, après réhydratation, les plantes retrouvent un fonctionnement normal [39]; [57].

Dans les chloroplastes, suite à ce déséquilibre ya formation des espèces activées de l'oxygène il existe de nombreux sites de génération d'EAO (Figure 1.5).

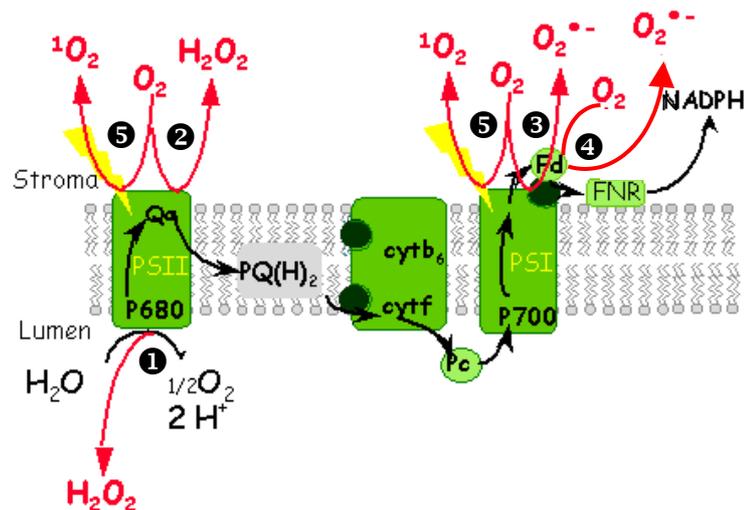


Figure 1.5 : Sites de génération d'EAO dans la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons.

Les EAO sont formées au niveau du complexe de dissociation de l'eau (1), aux sites accepteurs du PSII (2) et du PSI (3), au niveau de la ferredoxine réduite (4) et au niveau des antennes collectrices d'énergie (5).

Tout d'abord, au niveau du PSI, par auto-oxydation de la ferrédoxine réduite (réaction de Mehler, [64]), et minoritairement par l'auto-oxydation de l'accepteur primaire d'électrons du PSI.

De plus, l'anion superoxyde peut également être généré par auto-oxydation du PSII [65], bien que cette réaction semble minoritaire par rapport à la réduction de l'oxygène au niveau du PSI. Une autre source importante de production d'EAO se situe au niveau des antennes collectrices. En effet, de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) peut être formé par le transfert de l'énergie d'excitation de la chlorophylle à l'état triplet ($^3\text{Chl}^*$) à l'oxygène. La chlorophylle à l'état triplet est formée à partir d'une petite proportion de la chlorophylle excitée à l'état singulet [45]. De plus, dans des centres réactionnels isolés du PSII, le P680 à l'état triplet peut réagir avec l'oxygène et former de l'oxygène singulet [66].

Lors d'un stress hydrique modéré, une diminution de l'assimilation du CO_2 atmosphérique par la plante est généralement observée [56] ; [39].

A cet effet certaines plantes supérieures ont élaboré des stratégies d'assimilation du CO_2 leur permettant de limiter les pertes en énergie liées à la photorespiration [67] ; [68].

Les plantes sont classifiées en C3, C4 ou CAM, d'après les produits formés dans les phases initiales de la photosynthèse.

1.3.3.1 Les plantes de type C3 :

Le coton, le riz, le blé, l'orge, l'haricot, le tournesol et la pomme de terre, la plupart des légumineuses, des plantes ligneuses et maraîchères ainsi que beaucoup de mauvaises herbes, répondent plus à l'augmentation du CO_2 [69].

Dans le cas où le CO_2 devient limitant en particulier lorsque les stomates sont fermés lors d'un stress hydrique les plantes en C3 présentent le phénomène de la photorespiration (Figure 1.6). L'oxygène entre en compétition avec la fixation du CO_2 . Dans le chloroplaste, la RUBISCO peut, en présence d' O_2 transformer le RuBP en une molécule de PGA et une molécule d'acide phosphoglycolique : C'est la fonction oxygénase de la RUBISCO. Le PGA est incorporé dans le cycle de Calvin, tandis que l'acide phosphoglycolique, toxique pour la plante, sera transformé en glycine, au niveau d'un autre organelle cellulaire : le peroxyosome. Dans les mitochondries, deux molécules de glycine pourront se condenser pour donner une sérine, mais en entraînant la perte d'une molécule de CO_2 . Donc, dans le cas de la photorespiration, il y a perte d'un CO_2 au lieu d'avoir

fixation d'un CO_2 pour assimiler un gramme de CO_2 , de telles plantes perdent par transpiration plus de 600 grammes d'eau. C'est pourquoi certaines plantes, vivant dans des milieux plus difficiles doivent utiliser un système plus performant [37] ; [62].

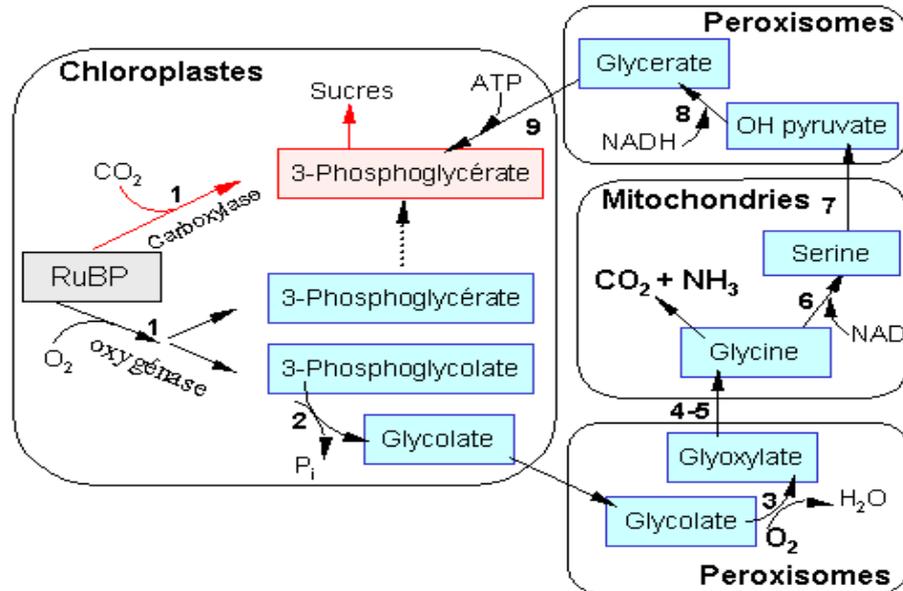


Figure 1.6 : Cycle photo-respiratoire, ou cycle photo-synthétique d'oxydation du carbone.

RuBP : ribulose 1,5-bisphosphate, 1 : Rubisco, 2 : phosphoglycolate phosphatase, 3 : glycolate oxydase, 4 : sérine-glyoxylate aminotransférase, 5 : glutamate-glyoxylate aminotransférase, 6 : sérine hydroxyméthyl transférase, 7 : glutamate-hydroxypyruvate aminotransférase, 8 : glycérate déshydrogénase, 9 : glycérate kinase. Les étapes du cycle photorespiratoire sont représentées en bleu, celles du cycle de Calvin en rouge.

1.3.3.2 Les plantes du type C 4 :

Le maïs, le sorgho, la canne à sucre, le mil, les halophytes répondent mieux que celle des C3 à une température plus élevée et leur efficacité à l'utilisation de l'eau, croît plus que les C3 [69]. Les plantes présentent une particularité anatomique, au niveau des feuilles, on peut observer une organisation des tissus en couronne. Une première couronne de cellules, la gaine vasculaire, entourent les vaisseaux conducteurs. Une couronne plus externe est formée par les cellules du mésophylle. Les communications entre les cellules du mésophylle et de la gaine sont facilitées par la présence de nombreux plasmodesmes.

L'épiderme est généralement recouvert d'une cuticule épaisse imperméable. Dans les cellules du mésophylle, le CO_2 s'associe au phospho-enol-pyruvate ou PEP pour former, grâce à l'action d'une enzyme spécifique la PEPcarboxylase, une molécule en C4, l'oxaloacétate. Selon les plantes, l'oxaloacétate va suivre des chaînes de réactions différentes mais qui aboutissent toutes au même résultat. Il y a formation d'une molécule de pyruvate dans les cellules de la gaine vasculaire et libération d'une molécule de CO_2 dans les chloroplastes de ces cellules. Le CO_2 suit alors le même trajet que chez les plantes C3 grâce à la présence de la RUBISCO dans ces chloroplastes, la photosynthèse nette des plantes C4 est près du double en rendement que celle des plantes en C3, elle favorise en plus un fonctionnement avec des échanges gazeux faible, tout en réduisant l'ouverture des stomates, limitant ainsi les pertes d'eau transpiratoires [37] ; [62] .

1.3.3.3 Les plantes de type Cam (Crassulacean Acid Metabolism) :

Ce sont des plantes qui ont un itinéraire C3 ou C4 optionnel de la photosynthèse selon les conditions du milieu. Comme plante CAM on peut citer le manioc, l'ananas, la figue de barbarie [69]. On ne retrouve pas de particularité anatomique chez ces plantes, bien qu'elles fonctionnent selon le même principe que les plantes en C4. Ici la différenciation est temporelle [37]. Les stomates sont fermés la journée pour protéger la plante de la dessiccation, le CO_2 est fixé la nuit par la PEPcarboxylase. Le principal avantage de ce métabolisme est que le CO_2 est « capté » la nuit pour former et stocker des molécules organiques. Le jour, ces molécules seront dégradées pour libérer du CO_2 . Ainsi les stomates peuvent rester fermés toute la journée pour limiter au maximum les pertes d'eau par transpiration [62].

1.4 LES DIFFERENTES FORMES DE REPOSES DES PLANTES AU STRESS HYDRIQUE :

Les dommages engendrés par le manque d'eau pour la plante sont importants, induisant une protéolyse accrue et l'inactivation de nombreux enzymes. Pour éviter la déshydratation, les plantes ont mis en place diverses stratégies en réponse au manque d'eau [7]. La diversité des types de plantes (hydrophytes, mésophytes ou xérophytes) et des milieux environnementaux font qu'il n'existe pas de réponse unique vis à vis du déficit hydrique. Différentes stratégies sont développées par les végétaux face à cette contrainte. Elles consistent à maintenir les tissus hydratés pendant le période de sécheresse, à fonctionner avec des tissus déshydratés, ou bien encore à accomplir les différents stades de développement en dehors de la période de stress [29].

En générales les végétaux sont caractérisés par une grande capacité à résister à des variations importantes de la teneur en eau de leurs tissus [14].

La réponse évolutive des végétaux face à la contrainte hydrique est apportée par une différenciation et une spécialisation marquée de certains organes, en vue d'une absorption efficace de l'eau située dans l'environnement proche de la plante (développement du système racinaire..), de son acheminement et de son maintien à proximité des cellules photosynthétiquement actives (succulence, sclérisation des tissus foliaires, etc.) [70].

1.4.1 Les mécanismes d'adaptation et de tolérance des plantes face au stress hydrique :

L'adaptation à la sécheresse de plantes cultivée peut être définie au sens de [71] comme « la capacité de la plante à croître et donner des rendements satisfaisants dans des zones sujettes à des déficits hydriques périodiques ».

Ces adaptations ont permis une relative indépendance des plantes supérieures homéohydriques vis à vis de la contrainte en eau, et leur a permis de coloniser les régions les plus arides du globe. La contrepartie réside en une faible production de biomasse qui s'explique selon [72] par le fait que le rendement en biomasse est fonction de la qualité d'eau transpirée et de l'efficacité d'utilisation de cette eau :

$$\text{Biomasse} = \text{transpiration (T)} \times \text{Efficacité d'utilisation de l'eau (EUE)}.$$

Selon les travaux de [73] ; [74], les différentes stratégies d'adaptation des plantes face à la sécheresse sont expliquées comme suit.

1.4.1.1 Mécanismes phénologique, physiologique et morphologique :

1.4.1.1.1 L'esquive :

Cette stratégie permet à la plante de ne pas subir directement la contrainte hydrique, grâce à une réalisation de son cycle en dehors des périodes sèches en particulier au cours de la phase sensible ou critique [70]. La précocité de l'épiaison chez les céréales est considérée comme une esquive [71]; [74], l'augmentation du gain de la précocité n'est toutefois pas sans inconvénient [75].

1.4.1.1.2 L'évitement :

L'évitement ou « tolérance par maintien d'un potentiel hydrique élevé » : cette stratégie consiste, pour la plante, à maintenir un état hydrique interne satisfaisant en présence d'une contrainte hydrique externe. Pour conserver un potentiel hydrique élevé, la plante contrôle les flux d'eau entrant au niveau des racines et sortant au niveau de la feuille. Ceci peut être obtenu par une réduction de la transpiration grâce à une fermeture rapide des stomates [76], et par une optimisation de l'absorption de l'eau par les racines, notamment grâce à un système racinaire profond [74] ; [76].

A. Contrôle des flux entrants :

La plante présente la capacité d'adapter son système racinaire en condition de déficit hydrique. Comme nous l'avons décrit précédemment, la croissance foliaire est rapidement inhibée par le manque d'eau, du fait de la diminution de la turgescence cellulaire, mais l'activité photosynthétique demeure peu inhibée lors des premiers stades de stress. Les produits de la photosynthèse sont alors acheminés vers le système racinaire et permettent d'assurer son développement et l'augmenter sa capacité à prélever l'eau [29] ; [37].

Il est à noter que le phénomène est observé chez des plantes en cours de développement végétatif. Si la plante est en fructification, les assimilats photosynthétiques sont prioritairement acheminés vers le fruit ([29],1980). Ainsi, les plantes en fructification voient leur capacité d'absorption d'eau limitée et donc leur sensibilité au déficit augmenter par rapport à des plantes sans fruits.

B. Contrôle des flux sortants :

La feuille développe des réponses morphologiques et anatomiques lui permettant de limiter les pertes en eau [67]. En condition de stress, elle peut se couvrir d'une couche cireuse au niveau des cellules de l'épiderme réduisant les pertes d'eau liée à la transpiration cuticulaire [39]. L'augmentation de la pilosité des feuilles lors d'un manque d'eau permet des échanges gazeux limités avec des pores stomatiques faiblement ouverts, et réduit l'échauffement de la feuille en augmentant sa réflectance. De même, l'enroulement des feuilles, induit par la perte de turgescence des cellules, permet de réduire considérablement la transpiration. Enfin, certaines plantes perdent leurs feuilles au début de la saison sèche [67].

1.4.1.1.3 La tolérance :

La tolérance à la sécheresse est définie par [77], comme étant l'expression concomitante de plusieurs caractères d'adaptation permettant une stabilité du rendement dans les environnements où les disponibilités en eau sont variables.

C'est la tolérance à un potentiel hydrique bas qui permet à la plante d'assurer ses fonctions physiologiques malgré une dégradation de son état hydrique interne consécutive à la contrainte hydrique, elle s'exprime par un maintien de la turgescence [70].

La capacité d'ajustement osmotique d'un végétal est liée à sa capacité à accumuler au niveau symplasmique, et de manière active, certains solutés [75].

Selon [76], cette classification est légèrement différente, en ne considère plus le potentiel hydrique comme paramètre de référence : certains caractères, comme l'ajustement osmotique ou l'augmentation de l'élasticité, sont alors considérés comme une réponse d'évitement et la tolérance à la déshydratation ne correspond plus qu'au seul mécanisme de tolérance protoplasmique. Parmi les mécanismes de tolérance en trouve, le maintien d'une activité physiologique (photosynthèse) [78], une stabilité membranaire élevée pour les traitements osmotiques et thermiques [79], un nombre élevé des grains par unité de surface [80]; [81], et un poids de 1000 grains élevé [78].

1.4.1.2 Mécanismes biochimiques :

1.4.1.2.1 Les sucres et leurs dérivés, les polyols :

Plusieurs polyols et sucres, tel que le pinitol, le glycérol, le mannitol, ou le sorbitol et le saccharose s'accumulent dans les cellules végétales soumises à un stress osmotique. Leur accumulation chez les plantes ne semblent avoir lieu que dans des tissus différenciés [93] Les polyols ou sucres alcools sont formés de chaînes carbonées linéaires (polyols acryliques) ou fermées (polyols cycliques). Les composés les plus fréquemment accumulés sont, pour les polyols acycliques, le mannitol formé à partir de mannose et le sorbitol à partir du glucose et les dérivés inositols pour les polyols cycliques [94] ; [95].

Chez les plantes, les polyols s'accumulent à des niveaux élevés dans le cytoplasme et dans le chloroplaste pour contrebalancer le fort potentiel osmotique de la vacuole lors de contraintes environnementales telle que la sécheresse, une forte salinité ou des températures élevées [95].

Des recherches montrent une corrélation entre l'accumulation de pinitol ou d'autres sucres alcools et une tolérance accrue à la sécheresse [96] ; [93]. Au niveau du compartiment chloroplastique, l'accumulation des sucres en réponse au manque d'eau semble contribuer à la protection des membranes thylacoïdiennes [97].

1.4.1.2.2 Synthèse des molécules aminées (les osmolytes) :

En condition de déficit hydrique, l'ajustement osmotique est un mécanisme permettant à la plante de préserver une pression de turgescence élevée malgré la déshydratation cellulaire.

Consécutivement à la perte en eau, des composés inorganiques, pour la plupart toxiques pour la cellule (par exemple les ions bivalents), s'accumulent dans la vacuole. Cette compartimentation au sein de la cellule végétale évite l'altération d'enzymes cytosoliques et chloroplastiques sensibles aux fortes concentrations en certains toxiques [7]. Pour assurer un équilibre du potentiel osmotique, des composés s'accumulent dans le cytoplasme [37]. Ces composés ou osmolytes sont dits compatibles [7] dans la mesure où, même à forte concentration, ils n'interfèrent pas avec les activités enzymatiques et les structures protéiques cellulaires. Les osmolytes présentent généralement une grande solubilité dans l'eau et ne sont pas chargés à pH neutre. Ils comprennent des acides aminés,

des composés ammonium quaternaires et ammonium sulfonium tertiaires et des hydrates de carbone [82].

A. La proline :

Les teneurs en cet acide aminé à l'état libre s'accroissent rapidement chez de nombreuses mono ou dicotylédones soumises à un stress salin et hydrique [83]. Cette augmentation de la quantité de proline cytoplasmique est consécutive à la stimulation de sa synthèse, résultant d'une élévation des quantités de messagers codant pour l'enzyme qui convertit le glutamate en proline [84] ; [85] ; [86] . Toutefois, deux voies de biosynthèse sont stimulées en condition de stress. La voie majeure part du glutamate et la voie mineure utilise comme précurseur l'ornithine [86].

B. Les bêtaïnes :

Des composés ammonium quaternaires et tertiaires ont été décrits comme des composés présentant des propriétés d'osmoprotection très marquées [87] ; [88]. La glycine bêtaïne est un amine quaternaire, composé ubiquitaire, dont la betterave est à l'origine du nom bêtaïne, car elle en contient des quantités importantes.

En cas de stress salin ou déficit hydrique, le niveau d'accumulation de la glycine bêtaïne est 2 à 10 fois supérieur à ceux des plantes stressées [88]. Sa synthèse est localisée dans les chloroplastes [89] . Elle est synthétisée par une oxydation en deux étapes successives. L'oxydation de la choline en bêtaïne aldéhyde, puis en glycine bêtaïne [90]. Ce composé semble donc jouer un rôle dans la stabilisation des structures de l'appareil photosynthétique, et en particulier une protection plus efficace de l'activité du PSII [91] ; [92].

1.4.1.2.3 Synthèse de protéines en réponse a une contrainte hydrique :

Dans la cellule végétale différenciée, De nombreux gènes voient leur expression augmenter lorsque les conditions environnementales changent et d'autres leur expression diminuer. Cette modification de l'expression du programme génétique de la cellule concerne aussi bien la production de protéines structurales que la synthèse d'enzymes impliquées dans les voie métaboliques spécifiques [98].

Lors d'un déficit hydrique, l'induction de l'expression de différents types de gènes a été mis en évidence [44]; [49].

A. Les protéines LEA(Late Embryogenesis Abundant) :

La maturation des graines se caractérise par une forte déshydratation des tissus jusqu'à un contenu en eau d'environ 5%. Des protéines, nommées LEA s'accumulent spécifiquement lors de ces dernières étapes de l'embryogenèse et disparaissent rapidement dans les premiers stades de la germination [99].

Ces protéines ont été initialement caractérisées chez le coton par [99] et regroupées dans différentes familles selon leur séquence : D-7, D-11(nommées déhydrines) , D-29, D-34 et D-113.

De nombreux gènes ayant des homologies de séquences avec les groupes de gènes LEA ont été mis en évidence chez plusieurs plantes supérieures comme le blé, la carotte, le maïs, l'orge, le radis, le riz, le soja, la tomate et le tournesol [100]. La plupart des LEA sont des protéines hydrophiles et stables jusqu'à une température de 100°C, ayant des structures souvent secondaires. Elles sont principalement cytosoliques [101], parfois nucléaires [102] et rarement chloroplastiques [103]. Des plantes de riz transgéniques surexprimant constitutivement une protéine LEA d'orge (HVA1) se développent mieux que les plantes témoins en condition de stress hydrique ou salin. Les plantes transgéniques présentent un retard dans l'apparition des symptômes nécrotiques et une récupération plus rapide après un arrêt du stress [104].

B. Les protéines DSP (Desiccation Stress Proteins) :

On retrouve ces protéines chez les plantes de désert de type poikilohydriques ou "résurrection" en raison de leur capacité d'adaptation à des déshydratations extrêmes. Ces plantes constituent des modèles de choix pour étudier les effets du déficit hydrique chez les végétaux supérieurs [103].

Sept gènes nucléaires activement transcrits et traduits en réponse à une forte déshydratation ont été isolés et recensés chez *Craterostigma plantagineum*, espèce africaine appartenant à la famille des Scrophulariacées [105] ; [106]; [107].

Les protéines codées par ces gènes ont été nommées DSP pour (Dessication Stress Protéins) la plupart de ces protéines sont détectées au niveau des feuilles des plantes soumises à une déshydratation, et sont absentes chez les plantes bien hydratées. Elles sont

localisées dans le cytosol, exceptées trois d'entre elles qui sont chloroplastiques, la protéine DSP21 qui s'accumule dans le stroma tandis que les protéines DSP22 et DSP 34 sont associées aux membranes thylacoïdiennes [106]; [103]. La protéine DSP21 montre une homologie avec une protéine LEA D-29 du coton et contient un octamère répété caractéristique des protéines LEA de type D-7 [100] ; [101]. La protéine DSP22 montre une homologie importante avec différents protéines induites par de fortes illumination chez les plantes supérieures et nommées ELIP pour (Early Light Inducible Proteins) [106]. Les protéines DSP14 et DSP16 présentent des caractéristiques des séquences polypeptidiques des LEA [103]; [107].

[107] ont proposé que les protéines DSP n'aient pas de fonction enzymatique particulière, mais aient plutôt un rôle de type structural dans la protection de la cellule en réponse à la dessiccation.

C. Les protéines CDSP (Chloroplatic Drought-Induced Stress Protein):

Ce sont des protéines qui s'accumulent dans le compartiment chloroplastique codées par le génome nucléaire. Deux protéines de 32 et 34 k Da ont été identifiées sur des plants de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) soumis à un déficit hydrique appelées CDSP 32 et CDSP34 pour (Chloroplatic Drought-Induced Stress Protein) [108] ; [109] ;[110].

➤ La protéine CDSP32 une thiorédoxine :

La protéine CDSP32 a été identifiée dans la fraction protéique soluble de chloroplastes est exclusivement dans le stroma. Une synthèse accrue de la protéine a été mise en évidence par électrophorèse bidimensionnelle dans le stroma des chloroplastes de plantes de pomme de terre soumises à un déficit hydrique par arrêt de l'arrosage pendant 10 jours. L'accumulation de la protéine CDSP32 dans le stroma des chloroplastes de plantes de pomme de terre a également été étudiée sous d'autres contraintes osmotiques, telles qu'un stress basse température ou un stress salin [109].

Des homologie notable apparaissent entre la région C-terminale de la protéine (111 acides aminés) et des protéines de la famille des thiorédoxines : 34% d'identité et 50,4% de similitude avec la thiorédoxine h2 du tabac et environ 25% à 30% d'identité avec des thiorédoxines du tabac (h1), d'épinard (f et m) et *d'Escherichia coli*. La protéine CDSP32 présente donc une activité de type thiorédoxine [110].

Les thiorédoxines sont de petites protéines (12-14 kDa) possédant un site actif très

réactif, composé de 4 acides aminée Cys-Gly-Pro-Cys, capable de réduire des ponts disulfures au sein de protéines cibles [111].

Elles sont réduites par la ferrédoxine-thiorédoxine réductase, qui tire ses électrons de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons via la ferrédoxine (Figure 1.7) [112].

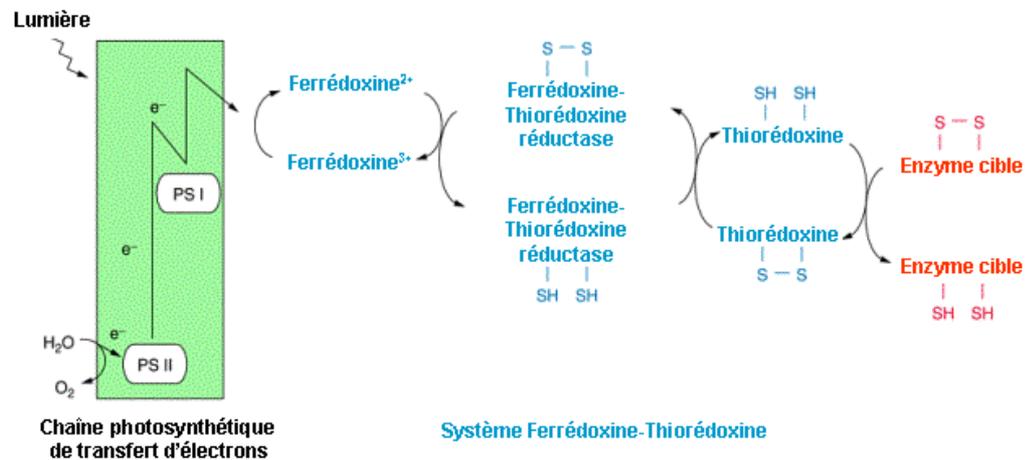


Figure 1.7: Représentation schématique du système chloroplastique ferrédoxine-thiorédoxine.

La ferrédoxine est réduite par les électrons provenant de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons (représentée en vert). Une partie de la ferrédoxine réduite sert de donneur d'électrons à la ferrédoxine-thiorédoxine réductase, qui peut réaliser une transition thiol-disulfure avec le site actif de la thiorédoxine oxydée. La thiorédoxine réduite peut réduire les ponts disulfures de diverses enzymes cibles, souvent inactives ou faiblement actives sous forme oxydée (d'après Ruelland et Miginiac-Maslow, 1999) [112].

Selon [113], [114], CDSP32 est le donneur d'électrons pour BAS1, permettant la réduction des lipides hydroperoxydes produits lors de contraintes oxydantes dans le chloroplaste. Le pouvoir réducteur fourni par la thiorédoxine CDSP32 à la peroxyrédoxine BAS1 pourrait provenir de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons via la ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR), comme c'est le cas pour les autres thiorédoxines chloroplastiques [112] (Figure 1.8).

BAS1 est une alkyl hydroperoxyde réductase soluble dans le stroma, BAS1, appartenant à la famille des peroxyrédoxines (Prx) à deux cystéines (2-CP), qui est active sous forme dimère. Ces peroxyrédoxines sont présentes chez les bactéries, les champignons et les mammifères, a été identifiée dans plusieurs espèces végétales [115] ; [116] ; [117].

Des analyses de chromatographie ont permis d'identifier en plus de BAS1 deux autres cibles de la thiorédoxine (CDSP32) : PrxQ une peroxyrédoxine qui active sous forme monomérique, et une méthionine sulfoxyde réductase de type B (Msr B) qui réduit les méthionines sulfoxydes et permet ainsi la réparation des protéines oxydées. Ces protéines recevraient leur pouvoir réducteur en état de stress de CDSP32 [118].

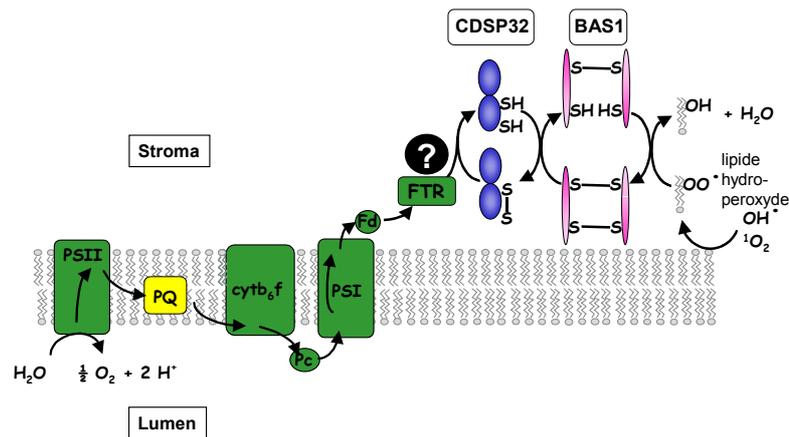


Figure 1.8: Modèle proposé par (Broin *et al.*, 2002) [113] la réduction des lipides hydroperoxydes thiorédoxine-dépendante dans le chloroplaste.

Les électrons provenant de la chaîne photosynthétique pourraient être transférés de la ferrédoxine aux lipides hydroperoxydes par la FTR, CDSP32 et BAS1 (PSII: photosystème II, PQ: plastoquinone, cytb₆f: cytochrome b₆f, Pc: plastocyanine, PSI: photosystème I, Fd: ferrédoxine, FTR: ferrédoxine-thiorédoxine réductase).

➤ La protéine thylacoïdienne CDSP34 :

C'est une protéine membranaire localisée dans la fraction protéique thylacoïdienne de la plante de pomme de terre [108]. La protéine CDSP34 de la pomme de terre a une grande similitude avec la fibrilline du poivron, elle stabilise les structures photosynthétiques, et pourrait protéger les thylacoïdes des dommages occasionnés par les composés toxiques produits au sein du chloroplaste en condition de stress [119].

Cette protéine est également induite par un stress salin, des basses températures, et une forte illumination [109]; [120].

Des plantes de tabacs transgéniques sur-exprimant la fibrilline de poivron dans le chloroplaste présentent un développement accru et une floraison plus précoce, par rapport aux plants sauvages, sous des intensités lumineuses élevées [121].

D. Les aquaporines :

En réponse à un déficit hydrique, des niveaux plus élevés en transcrits des gènes codant pour des aquaporines ont été observés au niveau des racines, des tiges et des feuilles des différentes plantes. C'est une catégorie de protéine membranaire qui s'accumule sous forme de structures en canaux d'où leur nom de aquaporines ou canaux à eau. Ce sont des protéines hydrophobes transmembranaires appartenant à la famille des protéines MIP (Major Intrinsec Proteins) présentes chez tous les organismes vivants. Ils interviennent dans le transport rapide de l'eau à travers les cellules et favoriser aussi le transport d'ions, de sucres et glycérol [122].

E. Les inhibiteurs de protéases :

Le déficit hydrique accélère le processus de sénescence qui est caractérisé par un certain nombre de modifications cellulaires, ce qui se traduit notamment par l'augmentation de l'activité des protéases [123]. Une protéine de 22 kDa, nommée BnD22 (Brassica napus Drought), s'accumulant dans les feuilles de colza en réponse à un déficit hydrique progressif ou à un stress salin [124], présente une identité avec les inhibiteurs de protéases de type Kunitz, caractérisé chez le soja [125].

La protéine purifiée présente une activité anti-protéolytique *in vitro* et une corrélation négative a été établie entre la quantité de BnD22 et l'activité endogène protéolytique des feuilles progressivement soumises à un déficit hydrique [126]. D'autres protéines de cette famille ont été caractérisées, notamment la protéine P22 chez le radis [127] ; [128] ainsi que la protéine WSCP (Water- Soluble Chlorophyll Protein) dans les feuille de *Brassica oleracea* soumise à une déshydratation [129].

Selon [130], les inhibiteurs de protéases sont supposés jouer un rôle dans la régulation du pool des protéines. Elles pourraient intervenir dans le processus de retardement de la sénescence occasionnée au cours d'un déficit hydrique [125].

1.5 REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES INDUITS EN CONDITION DE STRESS OSMOTIQUE :

[131] ont décrit deux types de protéines synthétisées en réponse au stress, celles présentant une fonction de protection de la cellule vis-à-vis du manque d'eau (canaux à eau, LEA, HSP, chaperonnes, enzymes de détoxification,..) et celle intervenant dans la régulation de l'expression des gènes induits en réponse au déficit hydrique. Diverses voies de régulation, allant de la perception du stress par la plante à l'expression de gènes spécifiques (Figure 1.9). L'ABA endogène joue un rôle important dans la régulation de l'expression de certains gènes [132]. Des voies transductionnelles dépendantes et d'autres indépendantes de l'ABA semblent coexister dans la régulation des gènes en réponse au manque d'eau [133].

1.5.1 Distribution de l'ABA chez les végétaux supérieurs :

L'acide abscissique (ABA) est une phytohormone qui est impliquée dans le contrôle de nombreux processus physiologiques chez les plantes [134], comme la maturation de l'embryon dans la graine, la germination [135] et aussi dans l'adaptation de l'appareil végétatif aux contraintes biotiques et abiotiques de la plante [136]. Une augmentation de la concentration de cette phytohormone est observée lors des changements dans l'environnement, conduisant à une déshydratation cellulaire [137]; [138].

L'ABA est considéré comme un médiateur essentiel dans la réponse de la plante aux diverses contraintes environnementales, telle que la sécheresse, forte salinité, et le froid. Et aussi dans l'adaptation de l'appareil végétatif aux contraintes biotiques et abiotiques de la plante [136]. L'ABA est considérée comme une hormone de stress [137]. Elle est continuellement synthétisée dans les racines et, dans une moindre mesure, à la base des feuilles dans les cellules du mésophylle [139]. L'ABA synthétisé au niveau des racines est transporté vers les parties supérieures de la plante via la sève brute du xylème, tandis que celui synthétisé par les feuilles différenciées est véhiculé jusqu'aux racines via la sève élaborée du phloème. C'est une boucle d'amplification systémique de la concentration en ABA [140].

1.5.1.1 Les voies de régulation des gènes dépendantes de l'ABA :

Une première voie nécessite la synthèse de facteurs protéiques pour induire l'expression des gènes en condition de déficit hydrique. C'est le cas du gène RD22

d'*Arabidopsis thaliana* dont l'expression nécessite la biosynthèse d'un facteur de transcription [141]. Une séquence de 67 pb du promoteur du gène est essentielle à l'expression du gène et présente des motifs conservés intervenant dans la fixation des facteurs transcriptionnels synthétisés à la suite d'une augmentation de la teneur en ABA [142].

La deuxième voie de régulation ne fait pas intervenir la synthèse des facteurs protéiques spécifiques. La régulation se fait également par la reconnaissance de séquences d'ADN spécifique, nommées ABRE (ABA Responsive Elements), par des facteurs protéiques [143].

1.5.1.2 Les voies de régulation des gènes indépendante de l'ABA :

De nombreux gènes induits en réponse à des contraintes osmotiques, telles que le déficit hydrique, une forte concentration en sel ou les basses températures ne nécessitent pas l'intervention de l'ABA.. Une séquence régulatrice spécifique de 9pb (TACCGACAT) a été identifiée dans la région promotrice du gène *rd 29A* chez *Arabidopsis thaliana* la séquence est nommée DRE (Dehydratation-Responsive Element) qui est reconnue par des facteurs transcriptionnels nucléaires [133].

L'interaction entre le gène et la séquence DRE conduit à l'expression du gène. La caractérisation de gènes exprimés en réponse à un déficit hydrique, non induits par l'ABA et ne présentant pas d'éléments DRE dans leur promoteur, suggère l'existence d'autres voie de régulation (Figure 1.9) [131].

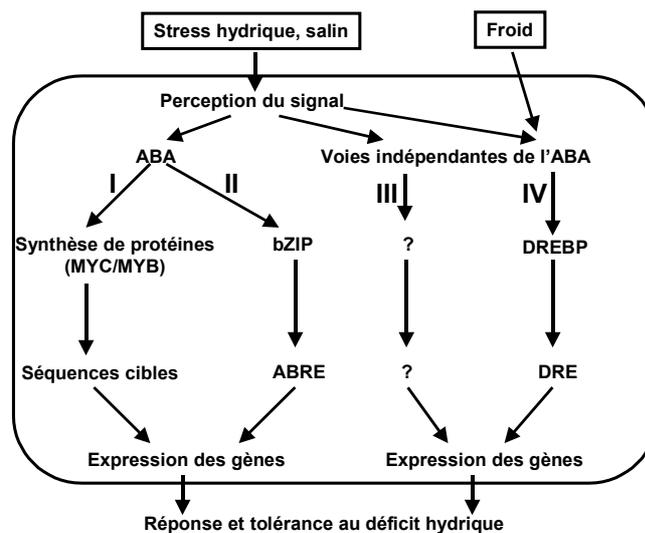


Figure 1.9: Voies de transduction du signal entre la perception d'un signal de stress hydrique et l'expression des gènes (d'après Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 1997) [131].

1.6 OBJECTIF DU TRAVAIL

Les objectifs de ce travail expérimental consistent à étudier la résistance de l'appareil photosynthétique de l'orge vis-à-vis du stress hydrique. six variétés d'orges ont été utilisées sous deux régimes hydriques (témoin et déficit hydrique). La comparaison s'est faite en utilisant une approche physiologique : Mesure du contenu relatif en eau (CRE), la seconde approche est d'ordre biophysique : Mesure de la fluorescence de la chlorophylle, la troisième est d'ordre biochimique : Dosages de la chlorophylle, et des protéines.

En deuxième partie nous avons poursuivi notre étude par une analyse biochimique sur le compartiment chloroplastique. La thématique de recherche du laboratoire d'écophysiologie de la photosynthèse (LEP) du commissariat à l'énergie Atomique (CEA) de Cadarache (France) porte sur les effets des contraintes environnementales sur la photosynthèse. Plus particulièrement les travaux de Pascal Rey sur le déficit hydrique ont permis de montrer l'accumulation en réponses au manque d'eau des protéines soluble (CDSP32) et membranaire (CDSP 34) chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L). Des analyses des protéines par des électrophorèses SDS PAGE, et immunodétection sur membrane (Western blot) en utilisant des plantes stressées et des témoins ont été réalisées, afin d'analyser les quantités de ces protéines dans les six variétés d'orge.

Dans la troisième partie nous avons complété notre étude par une électrophorèse bidimensionnelle afin d'identifier des protéines chloroplastique qui peuvent s'accumuler chez l'orge en réponse à un stress hydrique et seraient susceptibles de participer à la tolérance au stress hydrique.

De cette étude, des perspectives seront proposées en conclusion, Ce travail s'insère dans une approche globale. Il pourrait aboutir à identifier des protéines chloroplastique susceptibles d'être utilisées comme marqueurs dans un programme de sélection de nouvelles variétés tolérantes au stress hydrique.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 MATERIEL VEGETAL, CONDITIONS DE CULTURE ET TRAITEMENTS : EXPERIMENTAUX

2.1.1 Matériel végétal :

Il s'agit de 6 variétés d'orges à 6 rangs :

3 variétés sont homologuées répertoriées sur le catalogue officiel algérien de L'INSTITUT TECHNIQUE DE GRANDE CULTURE (ITGC):

V4=Saida 183 : une orge locale, issue de population de type printemps, semi-précoce très sensible au froid tardif elle est surtout cultivée sur les plaines intérieures ou le risque de gel printanier est moindre. Elle est considérée comme une espèce rustique.

V5=Rihane 3 : une orge sélectionnée par la station ITGC de sidi Bel –Abbès en 1994, à partir du matériel végétal en provenance de la syrie. C'est une variété de type alternatif. Elle a été retirée de la grande culture des Hauts-Plateaux de l'Est suite à sa sensibilité au gel tardif.

V6=Jaidor : une orge d'origine française de type printemps. Elle se caractérise par sa forte production d'épis par unité de surface.

3 nouvelles variétés en fin de sélection par l'ITGC pour essai à l'échelle nationale :

V3=12030RKB : c'est une sélection de la station ITCC de Kroub (Algerie).

V1=15030RKB : c'est une sélection de la station ITCC de Kroub (Algerie).

V2=38030RST : c'est une sélection de la station ITCC de Sétif (Algerie).

2.1.2 Conditions de culture :

Les plantes sont obtenues par semis direct de 10 graines d'orge par pot rempli de terreau désinfecté marque Klasmann, (tourbe de Sphaigne et coco) de composition définie (Annexe 01)

Il est apporté la même quantité de terreau soit 650g par pot, d' une capacité de 2 litres, les plantes sont cultivées au phytotron sous une intensité lumineuse de $120 \mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, une photopériode de 12 h, une température de 23°C le jour et 19°C la nuit avec une humidité relative de 60/80% (jour/nuit).

Après la levée des graines, on ne laisse que 7 plants par pot. Tout les pots sont arrosés avec la solution nutritive de [144] (Annexe 02) par un système goutte à goutte (Figure 2.1).



Figure 2.1 : Plantes d'orge arrosées par un système goutte à goutte automatique.

Le déficit hydrique progressif est appliqué au stade 4 feuilles, correspondant à 15 à 16 jours après semis, et début tallage, soit 24 à 25 jours après semis par un arrêt de l'arrosage, durant 8 jours pour provoquer le stress (Figure 2.2).

3 facteurs ont été étudiés avec deux répétitions effectuées dans le temps.

Facteur 1 : Variétés.(V1,V2,V3,V4,V5,V6)

Facteur 2 : Stade de développement.(stade 4 feuilles et stade tallage)

Facteur 3 : Stress.(Témoin et sans arrosage pendant 8 jours)

Les données sont analysées en utilisant le logiciel STATITCF avec un risque d'erreur $\alpha=5\%$ en utilisant le test Anova, Dans le cas où l'effet "traitement" est globalement significatif pour un facteur donné, Il faudra alors poursuivre l'analyse en choisissant le test de comparaison de moyennes, ce test de comparaison de moyennes permet de constituer

des groupes au risque de 1^{ère} espèce $\alpha=5\%$. La constitution des groupes homogènes se fait à partir des plus petites amplitudes significatives (p.p.a.s.).



Figure 2.2 : Effet du stress hydrique sur les plants des 6 variétés d'orges après 8 jours sans arrosage au stade tallage.

2.2 LES MESURES EFFECTUEES :

2.2.1 Le contenu relatif en eau (CRE) :

Le CRE a été mesuré sur des échantillons foliaires des feuilles bien développées. Les feuilles prélevées sont placées dans des tubes pour être immédiatement pesées afin de déterminer le poids frais (Pf) et ensuite placées dans des boîtes contenant de l'eau pendant 6 heures, la pesée des feuilles après réhydratation donne le poids réhydraté (Pr). Ces feuilles sont ensuite mises dans une étuve jusqu'à stabilisation du poids pour dessiccation à 80°C, pour déterminer par la suite le poids sec (Ps). Le Pf, Pr, Ps sont exprimés en grammes. Le CRE en % est calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{CRE (\%)} = \left[\frac{(\text{Pf} - \text{Ps})}{(\text{Pr} - \text{Ps})} \right] \times 100$$

2.2.2 Mesures de la fluorescence chlorophyllienne :

Une partie de l'énergie lumineuse captée par les antennes collectrices des photosystèmes n'est pas engagée dans la photochimie, mais dissipée sous forme de chaleur (dissipation non radiative) ou réémise sous forme de fluorescence par la chlorophylle 'a' (dissipation radiative). Le taux de dissipation par fluorescence est faible (3 à 4 %). A température ambiante, la fluorescence chlorophyllienne provient essentiellement du PS II avec une contribution restreinte du PS I. La mesure de fluorescence variable de la chl a (c'est à dire la part de fluorescence modulée par l'activité photochimique des photosystèmes) permet d'évaluer *in situ* les fonctionnements du PS II et de la chaîne de transferts d'électrons [145] (Figure 2.3).

Le principe du fluorimètre utilisé PAM 2000 (H. Walz, Effeltrich, Germany) a été décrit par [146]. La mesure est réalisée sur la face supérieure de disques foliaires. Pour cela, on prélève 8 à 10 feuilles bien développées d'où l'on coupe des segments rectangulaires de 2 cm de long sur chaque feuille. Les témoins étant conservés dans des boîtes de pétri contenant du papier filtre imbibé d'eau distillée tandis que les segments de plantes stressées sont conservés dans des boîtes de pétri contenant du papier filtre sec.

Les échantillons sont ensuite soumis, avant les mesures de fluorescence, à un traitement en les plaçant à l'obscurité pendant 20 minutes de façon à ce que tous les accepteurs primaires d'électrons (Q_A) du PS II soient oxydés.

La méthode repose sur l'utilisation de deux sources lumineuses. La première, modulée et de faible intensité, ne modifie pas l'état du PS II. Cette lumière, dite non actinique infrarouge (650 nm, 1,6 kHz) modulée, est d'une intensité suffisamment faible pour n'induire aucune séparation de charges au niveau du PS II qui donne la mesure du niveau de **la Fluorescence chlorophyllienne minimale (F_0)**, correspondant à la situation où tous les centres réactionnels du PS II sont "ouverts", c'est-à-dire que leurs accepteurs primaires d'électrons (Q_A) sont sous forme oxydés.

En additionnant à la lumière non actinique, un flash de lumière actinique saturante (1 sec, densité de flux photonique $8000 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, lampe Schott KL 1500), tous les centres réactionnels du PS II sont "fermés", c'est-à-dire que Q_A est sous forme réduite. **La fluorescence chlorophyllienne atteint alors son niveau maximal (F_m)**. Le rendement quantique maximal (Y) de la photochimie du PS II selon [147] est estimé par la formule suivante: $Y = [(F_m - F_0) / F_m]$, et permet d'évaluer le niveau de fonctionnement de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons.

Ce rapport est lié à la quantité de centres réactionnels des PSII effectivement réoxydés [148].

Ce ratio (Y), appelé F_v/F_m ou efficacité maximale du PSII, est de l'ordre de 0,8 dans des plantes cultivées en conditions normales.

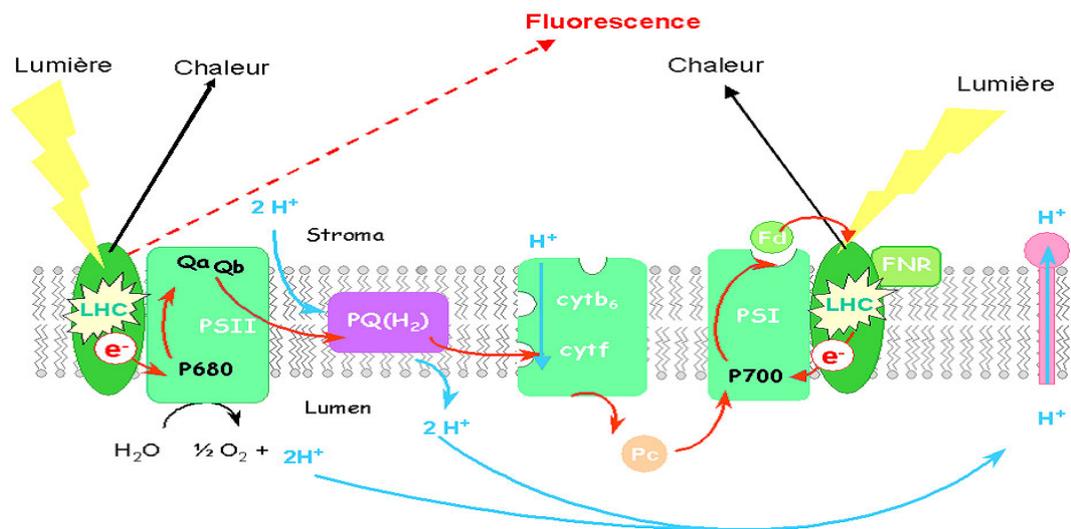


Figure 2.3 : Représentation schématique de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne dans le PSII.

L'énergie des photons émise par la lumière est absorbée par les antennes collectrices LHC : (Light Harvesting Complexe) qui sont constituées de chlorophylles et caroténoïdes. Cette énergie est dissipée sous forme de chaleur dans le PSI et PSII et sous forme de fluorescence principalement réémise par le PSII.

2.3 LES ANALYSES AFFERENTES A L'ETUDE BIOCHIMIQUE :

Les prélèvements des échantillons ont été effectués sur les mêmes feuilles qui ont servi pour le (CRE), les échantillons prélevés sont immédiatement placés dans du papier aluminium puis ils sont plongés dans de l'azote liquide à -196°C , ils sont ensuite transférés dans un congélateur à -80°C pour être stockés. L'eau utilisée pour tous les protocoles est une eau milli-Q très pure.

2.3.1 Extraction et dosage des protéines :

2.3.1.1 Extraction des protéines solubles foliaires :

Après broyage des échantillons foliaires préalablement stockés à -80°C dans l'azote liquide, la poudre est reprise dans le tampon d'extraction des protéines de 50 ml (Tableau 2.1) et filtré sur une mousseline (Scrynel) de porosité $48\ \mu\text{m}$. Le filtrat est agité pendant 20 minutes à 4°C , puis centrifugé ($48400g$, 4°C , 20 minutes). Les protéines solubles contenues dans le surnageant sont précipitées par addition de un volume et demi d'acétone à 100% et conservées à -20°C .

Tableau 2.1: Composition du tampon d'extraction des protéines foliaires solubles.

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
β -mercaptoéthanol	50 mM
PMSF	1 mM

2.3.1.2 Extraction des protéines membranaire foliaires :

Le culot récupéré lors de l'extraction de la fraction soluble, est repris dans un tampon de resuspension de 40 ml contenant (Tableau 2.2) et agité pendant 20 minutes à 4°C . Après centrifugation ($39191\ g$, 4°C , 20 minutes), les protéines membranaires du surnageant sont précipitées avec 4 volumes d'acétone à 100% et conservées à -20°C .

Tableau 2.2 : Composition du tampon d'extraction des protéines foliaires membranaire.

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
SDS	1 % (m/v)

2.3.1.3 Dosage des protéines solubles et membranaires pour l'électrophorèse :

Le dosage des protéines est réalisé selon une méthode BCA utilisant (Kit BCAssay, référence UP40840A). Grâce au dosage des protéines nous allons déterminer la quantité de protéines contenue dans chaque échantillon dans $200\ \mu\text{l}$ de solution. Après précipitation de la fraction protéique par centrifugation à ($14000g$, 4°C , 10 minutes), le culot est resuspendu dans $50\ \mu\text{l}$ d'une solution de SDS 0.2%. Le réactif BCA est préparé en

mélangeant 50 volumes de la solution 'A' incolore (référence UP95424A) et 1 volume de la solution 'B' bleu (référence UP95425), on met 1ml du réactif dans chaque échantillon, un blanc est préparé avec 50µl de SDS 0.2% en plus de 1ml du réactif. Après incubation des échantillons à l'étuve à 37°C pendant 30 minutes, on remarque l'apparition d'une coloration violette. L'absorbance des complexes colorés est lue par spectrophotométrie (Uvikon 942) à 562nm.

La concentration protéique des échantillons est déterminée à partir d'une gamme étalon de sérum albumine bovine standard (référence UP36859A), mémorisée dans l'ordinateur du spectrophotomètre, on utilise le programme BCA PROT, l'autozéro est effectué contre le blanc du dosage, les résultats sont exprimés en µg par cuve.

2.3.1.4 Dosage de la chlorophylle :

La détermination de la teneur en chlorophylle est réalisée par dosage spectrophotométrique. 0.1g de feuilles sont broyées et repris dans une solution de 25 ml d'acétone à 80 %, placés sous agitation(1h à 4°C) à l'obscurité, placés une heure à -20°C après centrifugation (30400g, 4°C, 20 minutes). On prélève 1 ml du surnageant pour le dosage, un blanc est préparé avec 1ml d'acétone à 80%, la teneur en chlorophylle est dosée par la mesure de l'absorbance à 645 et 663 nm. La concentration est calculée d'après la formule de [149].

$$[\text{chlorophylles } (a + b)] = (20,315 \times A_{645}) + (8,05 \times A_{663}) \mu\text{g.ml}^{-1}$$

2.3.1.5 Dosage des protéines foliaires totales :

Après broyage à l'azote liquide des échantillons foliaires de 0.1g préalablement pesés et stockés à -80°C. La poudre est reprise dans le tampon d'extraction des protéines (50 mM Tris-HCl pH 8,0 et 1 % SDS) de 5ml pour chaque échantillon.

Ils sont ensuite énergiquement agités pendant 1 h à 4°C, Les protéines contenues dans le surnageant sont précipitées par addition de 25 ml d'acétone à 100%. On prélève une fraction protéique de 200µl qu'on précipite par centrifugation à (14000 g, 4°C, 20 minutes), le culot est solubilisé dans 50µl d'une solution de SDS 0.2%. Le réactif BCA est préparé comme précédemment expliqué(dosage des protéines). Le dosage est effectué par spectrophotométrie à 562nm.

2.3.1.6 Extraction des protéines chloroplastiques :

2.3.1.6.1 Purification des chloroplastes :

Les chloroplastes sont purifiés sur gradient de Percoll selon une méthode modifiée de [150]. Toutes les étapes de l'extraction sont réalisées à 4°C.

Les feuilles (8 g de matière fraîche) sont découpées en morceaux et broyées dans (Waring-Blendor dans un bol d'un volume de 120 ml) trois fois de suite pendant 3 sec sur "low" dans 50 ml de **milieu A** (Tableau 2.3) + **DTT** (77mg/100 ml), on récupère après chaque broyage le jus du mélange, les 150 ml du mélange ainsi recueillis sont filtrés sur deux mousselines (Scrynel) de 250 µm de porosité, puis sur deux mousselines de 60 µm. Après centrifugation (1089g, 4°C, 3 minutes), on élimine le surnageant.

Les chloroplastes sont délicatement remis en suspension dans 4 ml de **milieu A** et déposés sur un gradient discontinu de Percoll (Pharmacia, référence P1644) composé d'une couche supérieure de 18 ml à 40 % (v/v) et d'une couche inférieure de 7 ml à 90 % (v/v). Lors d'une centrifugation (godets oscillants, 3920 g, 4°C, 15 minutes), les chloroplastes intacts migrent à l'interface des deux coussins de Percoll, les mitochondries et les débris chloroplastiques ne pénètrent pas dans la phase à 40 % de Percoll, et l'amidon se retrouve dans le culot au fond du tube (Figure 2.4). Les chloroplastes intacts sont délicatement récupérés par aspiration et lavés dans 20 ml de milieu A. Après centrifugation (1089 g, 4°C, 5 minutes), le culot est repris dans un tampon de stockage (Tableau 2.4) environ 800µl par tube et conservé à -80°C. Le choc congélation/décongélation et la faible osmolarité du tampon de stockage permettent la lyse des chloroplastes.

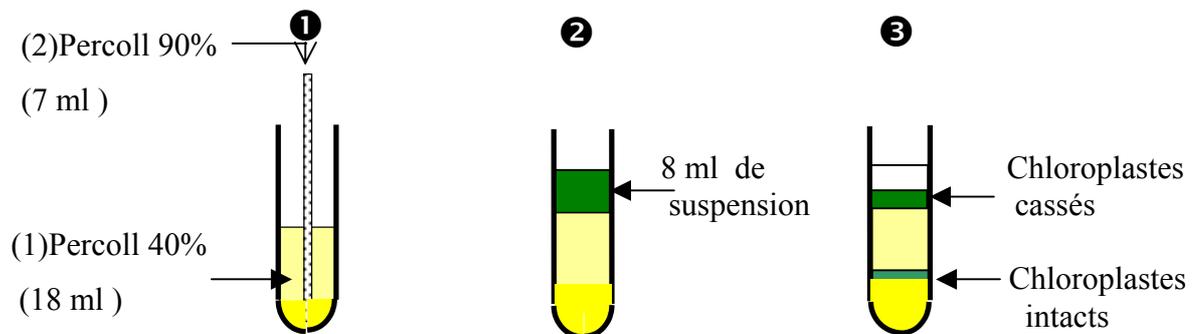
La détermination de la teneur en chlorophylle est réalisée par dosage spectrophotométrique. 30 et 50 µL de la suspension de chloroplastes sont repris dans une solution d'acétone de 900µl à 80 % et placés une heure à -20°C. La teneur en chlorophylle totale du surnageant est dosée par la mesure de l'absorbance à 645 et 663 nm. La concentration est calculée d'après la formule de [149].

Tableau 2.3 : Composition du milieu A.

Tricine-NaOH pH 7,8	50 mM
Sorbitol	0,33 M
EDTA	2 mM
MgCl ₂	1 mM
Acide Ascorbique	2 mM
DTT (extemporanément)	5 mM

Tableau 2.4 : Composition du tampon de stockage hypotonique des chloroplastes.

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	2 mM
NaCl	15 mM
Inhibiteur de protéases : - PMSF (extemporanément)	1 mM

**Figure 2.4** : les étapes de la séparation des chloroplastes intacts en utilisant un gradient du percoll:

- ① : Préparation des deux couches de percoll.
- ② : Dépôt de la suspension est centrifugation dans des godets oscillants.
- ③ : Séparation entre les chloroplastes intacts et les chloroplastes cassés.

2.3.1.6.2 Extraction des protéines solubles (S1) :

Un volume 200 μ l de suspension chloroplastique lysée est incubé avec un volume de 800 μ l de tampon S1 (Tableau 2.5) sous agitation forte pendant 1 h à 4°C. Les protéines stromales sont récupérées dans le surnageant après centrifugation (10000 g, 4°C, 10 minutes), puis précipitées par addition d'un volume et demi d'acétone à 100% et conservées à -20°C.

Tableau 2.5 : Composition du tampon d'extraction des protéines solubles (S).

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	1 mM
Inhibiteur de protéases : - PMSF (extemporanément)	1 mM

2.3.1.6.3 Extraction des protéines membranaires (M) :

Le culot obtenu lors de l'extraction de la fraction S1 est repris dans un tampon d'extraction (Tableau 2.6) et agité pendant 1 h à 4°C. Après centrifugation (10000 g, 4°C, 30 minutes), les protéines membranaires du surnageant sont précipitées avec 4 volumes d'acétone à 100% et conservées à -20°C.

Tableau 2.6 : Composition du tampon d'extraction des protéines membranaires (M).

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	1 mM
SDS	1 % (m/v)
Inhibiteur de protéases : - PMSF (extemporanément)	1 mM

2.3.1.7 Electrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes :

L'électrophorèse SDS-PAGE est une technique de séparation des protéines selon leur masse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS [151]. Le SDS, détergent anionique, se fixe de façon uniforme sur les protéines par interaction hydrophobe et les charge négativement. Les protéines dénaturées possèdent la même densité de charges négatives et

migrent donc en fonction de leur masse moléculaire. On prélève les volumes correspondant à 150 µg de protéines sur la base du dosage des protéines. Les échantillons sont centrifugés (14000g, 10 minutes, 4°C).

Le culot est repris dans 150µL de tampon de charge (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, β-mercaptoéthanol 5%, glycérol 10%, bleu de bromophénol). Les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 10 minutes pour les protéines membranaires et 5 minutes pour les protéines solubles, Les tubes sont centrifugés quelques secondes pour culotter les protéines non solubilisées et éliminer la condensation. Les protéines sont déposées (10 à 15 µl/piste) sur un gel de concentration à 5 % d'acrylamide (m/v) (Tableau 2.7), le reste des échantillons est stocké à -20°C. Après 15 à 20 minutes à 90 V, les protéines déposées dans les puits pénètrent dans un gel de séparation à 13 % d'acrylamide (m/v) (Tableau 2.8) où la migration dure 1 h 30 minutes environ à 150 V jusqu'à la sortie du gel du front de migration. L'électrophorèse baigne dans un tampon de migration dénaturant (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1%), en employant le système "Modular Mini-PROTEAN II" (Bio-Rad). Des marqueurs de taille sont utilisés pour chaque gel et mis dans un puits de manière à déterminer les masses apparente des protéines séparées.

Tableau 2.7: Composition du gel de concentration d'acrylamide à 5% (m/v) (pour 4 gels)

Protogel 40 % (m/v) acrylamide	1,25 ml
Tris-HCl pH 6,8 (1,5 M)	2,5 ml
SDS 10 % (m/v)	100 µl
H ₂ O	6 ml
Temed	10 µl
APS 10 % (m/v)	100 µl

Tableau 2.8 : Composition du gel de séparation d'acrylamide à 13% (m/v) (pour4 gels)

Largeur du gel	1 mm
Protogel 40 % (m/v) acrylamide	6.5 ml
Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	5 ml
SDS 10 % (m/v)	200µL
H ₂ O	8.1 ml
Temed	8 µl
APS 10 % (m/v)	200µl

2.3.1.8 Révélation des protéines par coloration au bleu de Coomassie :

Après électrophorèse en conditions dénaturantes, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie. Après 3 lavages à l'eau bidistillée à intervalle de 5 minutes sur un agitateur à faible vitesse, le gel est immergé dans 20 ml de bleu de coomassie sous agitation douce pendant 45 minutes. Ce traitement permet la fixation irréversible des protéines dans le gel et leur coloration. Le gel est ensuite trempé dans de l'eau bidistillée pour décoloration. La révélation au bleu de Coomassie permet une détection des protéines à partir d'un seuil de sensibilité d'environ 0,1 µg et pour vérifier l'homogénéité de chargement des puits dans le gel.

2.3.1.9 Révélation des protéines par coloration au nitrate d'argent :

Après électrophorèse, le gel est coloré au nitrate d'argent selon le protocole décrit par [152]. Le gel est incubé dans une solution fixatrice (éthanol 40%, acide acétique 10%) pendant 30 minutes, puis dans une solution contenant de l'éthanol 30%, de l'acétate de sodium 6,8%, du glutaraldéhyde 1,3% et du thiosulfate de sodium 0,2% pendant 30 minutes avec un volume final de 50 ml par gel. Après 3 lavages successifs de 5 minutes dans 50 ml par gel dans de l'eau bidistillée pure, le gel est incubé dans une solution de nitrate d'argent 0,1% (m/v) contenant 0,03% (v/v) de formaldéhyde pour un volume final de 50 ml par gel pendant 30 minutes avant d'être développé dans une solution de carbonate de sodium (2,5% m/v) contenant 0,132% (v/v) de formaldéhyde pour un volume final de 100 ml par gel. On effectue le développement en deux étapes, pour le premier bain on utilise une petite quantité jusqu'à ce qu'il vire au gris-marron, pour le second bain on agite jusqu'à l'intensification des spots. La réaction est arrêtée en plaçant le gel dans une solution d'EDTA (1,46% m/v) pendant 10 minutes. Le gel est lavé dans deux fois 5 minutes dans l'eau bidistillée. La révélation au nitrate d'argent permet une détection des protéines à un seuil de sensibilité de 5 à 10 ng.

2.3.1.10 Immunodétection sur membrane (Western blot) :

2.3.1.10.1 Electrotransfert :

Après électrophorèse en conditions dénaturantes, les protéines sont transférées en semi-sec sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 µm (*Pall Gellman Science*) avec un appareil de transfert (« *Graphite Electrobloetter System* », *The WEP Company*) constitué

d'électrodes de graphite. Le gel est déposé sur la membrane de nitrocellulose, l'ensemble étant pris en "sandwich" entre 4 épaisseurs de papier Whatman imprégné de tampon de migration SDS-PAGE contenant 10% d'éthanol [153]. Le transfert s'effectue pendant 30 minutes sous ampérage constant de 2 mA.cm^{-2} . L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration réversible des protéines dans une solution de rouge Ponceau (S) 2% (m/v) contenant 5% (v/v) d'acide acétique.

2.3.1.10.2 Immunodétection :

Les membranes de nitrocellulose sont placées pendant 20 minutes à température ambiante dans le tampon TBST (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, NaCl 159 mM, Tween 20 à 0,02%) additionné de lait écrémé en poudre à 5 % (m/v) afin de bloquer les sites non spécifiques de reconnaissance par les anticorps sous agitation douce. Les membranes sont ensuite incubées pendant 2 h à température ambiante ou une nuit à 4°C dans 10 ml par membrane de TBST contenant l'anticorps primaire. Le sérum dirigé contre CDSP34 est employé dilué au $1/1000^{\text{ème}}$. Le sérum dirigé contre CDSP32 est employé dilué au $1/1000^{\text{ème}}$. Le sérum dirigé contre BAS1, est employé dilué au $1/10000^{\text{ème}}$. Le sérum dirigé contre MsrB2 est employé dilué au $1/1000^{\text{ème}}$.

Après 3 lavages de 10 minutes dans le tampon TBST, une incubation de 1 h est réalisée à température ambiante dans 10 ml par membrane de TBST contenant l'anticorps secondaire dirigé contre les immunoglobulines G de lapin et couplé à la phosphatase alcaline dilué au $1/10000^{\text{ème}}$. Après 3 lavages dans le tampon TBST, la révélation de l'activité phosphatase alcaline se fait par addition de 66 μL du substrat BCIP 2,5% (dans du N,N-diméthylformamide) et de 66 μl de NBT 5% (dans du N,N-diméthylformamide 70%), dans 10 ml par membrane de tampon de révélation (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM). La réaction est arrêtée par rinçage des membranes dans de l'eau distillée.

Nous avons aussi utilisé un anticorps secondaire dirigé contre les immunoglobines G de lapin et couplé à la peroxydase dilué au $1/12000^{\text{ème}}$. Après 3 lavages dans le tampon TBST, la révélation de la peroxydase se fait on utilisant le kit (Uptilight HRP Blot chimiluminescence substrat), qui contient en substrat de la peroxydase émettant de la luminescence. Après réaction, la membrane est en suite déposée dans une cassette pour être développée dans une chambre noire sous lumière rouge sur un film ECL pour la détection de la chimiluminescence.

2.3.1.11 Electrophorèse bidimensionnelle :

L'électrophorèse bidimensionnelle comme son nom l'indique, est une combinaison de deux électrophorèses. La première dimension consiste en une isoélectrofocalisation (IEF), c'est à dire à une séparation des polypeptides selon leur point isoélectrique (pI), puis une seconde dimension réalisée en présence d'un tampon (le MOPS-SDS), permet une séparation des polypeptides selon leur masse moléculaire. Pour cela nous utilisons le *ZOOM IPG Runner système, Invitrogen*.

On prélève les volumes correspondant à 30 µg de protéines on les calculant sur la base du dosage des protéines . Les échantillons sont centrifugés (14000g, 10 minutes, 4°C). Le culot est repris dans 310 µL de milieu de réhydratation (Tableau 2.9) préalablement aliquoté en 1 ml et conservé à -20 °C , au quelle on ajoutera (20 mM de DTT) juste avant son utilisation. Ceci dénaturera et solubilisera les protéines.

Pour la première dimension nous utilisons des cassettes à 6 puits (ZOOM IPGRunner Cassettes, ZM0001, Invitrogen). On dépose 155 µl du mélange par piste dans les puits du gel. On insère ensuite un strip (ZOOM Strips, ZM0004) par puits, on laisse les strips se réhydrater toute la nuit, après avoir scellé la cassette à l'aide d'un ruban adhésif.

Le lendemain après avoir enlève les rubans adhésifs, on les remplace par du papier filtre réhydraté par 750 µL d'eau distillée. On procède au montage dans le système *ZOOM IPGRunner Mini-cell*. La migration dure 80 minutes environ par un voltage en étapes (200V pour 20 minutes ; 450V pour 15 minutes ; 750V pour 15 minutes ; 2000V pour 30 minutes. Une fois la migration terminée, les strips peuvent être stockés à -80°C pour être conservés.

Tableau 2.9 : Composition du milieu Réhydratation.

Concentration (1x) pour un volume de 25ml

Urea	8M
CHAPS	2 %
Ampholytes	0.5%(v/v)
Bromophenol Blue	0.002 %

Pour la seconde dimension on procède tout d'abord a la décongélation du strip. On passe ensuite a la phase équilibrage. En incubant le strip dans 5ml de LDS (1X) (Tableau 2.10) additionné de DTT 50mM pour 15 minutes, le second bain sera dans 5 ml

de LDS contenant 116 mg d'iodoacétamide avec 5ml de LDS (1X). On coupe la partie plastique située sur les deux côtés ensuite on le dépose délicatement à l'aide de pinces en haut du gel 2D de polyacrylamide composé de 4-12 % de Bis-Tris. On fait descendre délicatement le strip à l'aide d'une spatule dans le gel. On verse délicatement environ 400µl d'agarose 0,5% préalablement préparé avec tampon MOPS-SDS sur le strip.

L'électrophorèse baigne dans un tampon de migration dénaturant MOPS-SDS (Tableau 2.11), on emploie le système *Cell Sure Lock Min -Cell (Invitrogen)* pour la migration, un marqueur de taille est utilisé pour déterminer les masses apparentes des protéines séparées

Le voltage est réglé à 200 V pour 40 à 50 minutes de migration.

Tableau 2.10 : Composition du milieu LDS de concentration (4X)

Tris-HCl	(106mM)
Tris-base	(141 mM)
LDS	(2%)
Glycerol	(10%)
EDTA	(0.51 mM)
SERVA Bleu G250	(0.22mM)
Phenol Red	(0.175mM)
PH8.5	

Tableau 2.11 : Composition du milieu MOPS-SDS.

MOPS	(50mM)
Tris base	(50mM)
SDS	0.1%
EDTA	(1mM)
pH 7.7	

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 EFFET DU TRAITEMENT HYDRIQUE SUR DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES, BIOPHYSIQUES ET BIOCHIMIQUES :

Les six variétés d'orge ont été soumises à un déficit hydrique durant 8 jours aux stades 4 feuilles, stade tallage, quant aux plantes témoins elles ont été arrosées sans restrictions.

3.1.1 Le contenu relatif en eau(CRE) :

3.1.1.1 Résultats :

Les valeurs exprimant les résultats du CRE sont représentées dans le Tableau 3.1 et illustrées par la Figure 3.1. Ils montrent une différence de comportement entre les 6 variétés d'orge sous stress hydrique pour les deux stades étudiés.

Tableau 3.1 : Contenu relatif en eau (CRE) pour les 6 variétés d'orge stressées et témoins, avec une application d'un déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et stade tallage.

CRE(%)								
Variétés	Plantes Non stressées				Plantes stressées			
	Stade 4 feuilles		Stade Tallage		Stade 4 feuilles		Stade Tallage	
	Moyennes	Ecart type	Moyennes	Ecart type	Moyennes	Ecart type	Moyennes	Ecart type
V1	98.32	1.05	97.01	0.79	51.57	1.86	42.35	3.27
V2	97.63	1.54	96.23	0.42	45.73	4.81	35.31	1.71
V3	97.29	0.86	96.82	0.20	57.04	10.65	44.46	1.71
V4	97.29	0.38	97.33	0.33	55.72	11.11	47.84	1.11
V5	97.37	0.69	96.99	0.15	71.12	1.52	57.14	9.00
V6	97.82	0.54	97.46	0.04	62.42	2.51	54.74	1.66

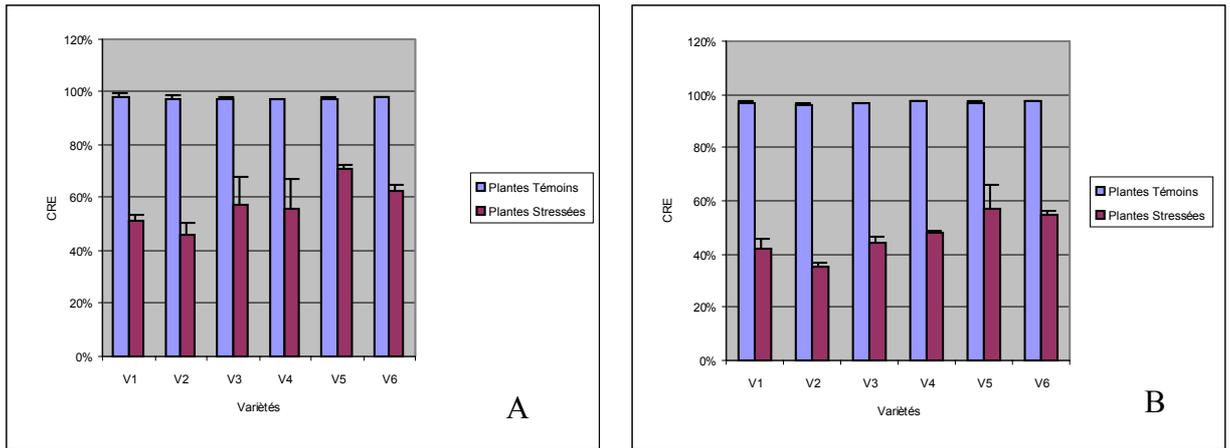


Figure 3.1 : Représentation sous forme d’histogrammes des données concernant le contenu relatif en eau (CRE) entre les plantes témoins et les plantes stressées, après un déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et tallage.

A :Stade 4 feuilles. B :Stade tallage.

3.1.1.1.1 Analyse de la variance :

L’analyse de variance pour cette variable (CRE) est représentée par le Tableau 3.2. Il ressort de cette analyse l’interaction non significative entre les trois facteurs étudiés. Le facteur variété représenté par le facteur n°1, le facteur stade de développement représenté par le facteur n°2 et le facteur stress hydrique représenté par le facteur n°3, leur probabilité est supérieure au risque d’erreur $\alpha = 5\%$ seuil fixé pour toutes les analyses statistiques effectuées.

Tableau 3.2 : Analyse de la variance de la variable le contenu relatif en eau (CRE).

(CRE)	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	26938.05	47	573.15				
VAR.FACTEUR 1	713.27	5	142.65	9.01	0.0001		
VAR.FACTEUR 2	359.00	1	359.00	22.67	0.0001		
VAR.FACTEUR 3	24487.11	1	24487.11	1546.58	0.0000		
VAR.INTER F1.2	17.55	5	3.51	0.22	0.9482		
VAR.INTER F1.3	685.16	5	137.03	8.65	0.0001		
VAR.INTER F2.3	279.22	1	279.22	17.64	0.0004		
VAR.INTER F1.2.3	16.75	5	3.35	0.21	0.9527		
VAR.RESIDUELLE 1	379.99	24	15.83			3.98	5.3%

L'interaction du facteur variété avec le facteur stade de développement ne présente pas non plus une différence significative, dont la probabilité est supérieure à 5%. Par contre il y a une interaction très hautement significative entre les différentes variétés et le régime hydrique appliqué (Témoin et Stressée), et entre le facteur variété et le facteur stade de développement. En reprenant les 3 facteurs individuellement, on note une différence très hautement significative du facteur n°1 (variété) qui représente une probabilité inférieure à 1%, ce qui présente une différence comportementale des 6 variétés, d'où une différence de leur CRE. Le stade de développement présente aussi une différence très hautement significative, de même pour le facteur stress.

3.1.1.1.2 Test de NEWMAN-KEULS $\alpha = 5\%$:

➤ Facteur Variété :

Ce test, classe les différentes variétés en 5 groupements homogènes. La variété V5, qui présente les CRE les plus élevés en condition de manque d'eau prend la première position (groupe A), suivie de très près de la variété V6 qui appartient au groupe AB. En dernière place, on retrouve la variété V2 (Tableau 3.3). Il en résulte bien une différence génotypique entre les variétés.

Tableau 3.3 : Moyennes et groupes homogènes du facteur variété pour la variable, contenu relatif en eau (CRE).

Variétés	Moyennes	Groupes Homogènes
V5	80.65	A
V6	78.11	A B
V4	74.54	B C
V3	73.90	B C
V1	72.31	C D
V2	68.72	D

➤ Facteur Stade :

Les moyennes du CRE enregistrées placent le stade 4 feuilles avant le stade tallage. Cela peut s'expliquer par le fait qu'au stade tallage, les plantes d'orge présentent beaucoup de feuilles, d'où une production importante en vert, donc une perte plus importante d'eau qui est représentée par un CRE de l'ordre de 72% alors que le CRE atteint environ 77.55% au stade 4 feuille (Tableau 3.4).

Tableau 3.4 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stade de développement pour la variable contenu relatif en eau (CRE).

Stades	Moyennes	Groupes Homogènes
4 Feuilles	77.44	A
Tallage	71.97	B

➤ Facteur Stress :

Les plantes témoins présentent en générales un CRE plus élevé que les plantes tressées avec une différence de l'ordre de 45.17% entre les deux régimes hydriques (Tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stress pour la variable le contenu relatif en eau (CRE).

Stress	Moyennes	Groupes Homogènes
Témoins	97.29	A
Stress	52.12	B

➤ Interaction variété - Stress :

Toutes les variétés en conditions témoins appartiennent au même groupe qui est le groupe A. une différence apparaît en condition de manque d'eau, en passant au régime hydrique stressé on remarque la formation de 3 groupes distincts dominés par les variétés V5 et V6, suivies respectivement par les variété V4, V3, V1 et par la variété V2 en dernière position avec un CRE de l'ordre de 40,52% (Tableau 3.6).

Tableau 3.6 : Moyenne et groupes homogènes de l'interaction entre le facteur variété et le facteur stress pour la variable, contenu relatif en eau (CRE).

Interaction Variété - Stress	Moyennes	Groupes Homogènes
Variété 1 - Témoin	97.66	A
Variété 6 - Témoin	97.64	A
Variété 4 - Témoin	97.31	A
Variété 5 - Témoin	97.18	A
Variété 3 - Témoin	97.05	A
Variété 2 - Témoin	96.93	A
Variété 5 – Stress	64.13	B
Variété 6 – Stress	58.58	B
Variété4 – Stress	51.78	C
Variété3 – Stress	50.75	C
Variété1 – Stress	46.96	C
Variété 2 – Stress	40.52	D

➤ Interaction Stade-Stress :

Les plantes témoins des 6 variétés pour les deux stades appartiennent au premier groupe (A). Pour les plants stressés on remarque la présence de deux groupes, l'interaction stade tallage avec le facteur stress présente une moyenne de CRE plus faible (Tableau 3.7) dû à la présence d'un couvert végétal plus intense d'où à une surface d'évaporation plus importante enregistrée à ce stade de développement.

Tableau 3.7: Moyennes et groupes homogènes de l'interaction entre le facteur stade de développement et le facteur stress pour la variable contenu relatif en eau.

Interaction Stade - Stress	Moyennes	Groupes Homogènes
4 Feuilles- Témoin	97.62	A
Tallage- Témoin	96.97	A
4 feuilles- Stress	57.27	B
Tallage- Stress	46.97	C

3.1.1.2 Discussion :

On remarque qu'au bout de 8 jours de stress les plantes stressées présentent visiblement un flétrissement. Le calcul du (CRE) présenté dans le Tableau 3.1 et la Figure 3.1, montre bien la différence entre les variétés stressées aux deux stades de développement tandis que les témoins sont tous à un niveau de CRE proche de 100% sous les deux stades de développement.

Sous déficit hydrique, la variété V5 montre une variabilité de son CRE entre le stade 4 feuille et le stade tallage en comparaison avec les autres variétés (Figure 3.1). Au stade 4 feuilles la variété V5 se classe en première position avec un CRE de l'ordre de 70% mais chute à environ 51% en passant au stade tallage en se classant ainsi en deuxième position. Ces résultats paraissent en accord avec les conclusions de [154] sur terrain, qui montrent que la variété V5 donne un rendement élevé mais instable quand les conditions deviennent défavorables. On peut déduire que la résistance de V5 face à un stress pourrait dépendre du stade auquel elle est touchée. Elle peut présenter une tolérance au déficit hydrique à un stade végétatif donné et ne pas présenter cette tolérance à autre stade végétatif. Il n'y a pas de tolérance globale de la variété mais des niveaux de tolérance dépendant, du moment où intervient le manque d'eau.

L'interaction du facteur stade de développement avec le facteur stress hydrique montre que le stade tallage présente un CRE plus bas par rapport au stade 4 feuilles.

Sous un stress hydrique de 8 jours, la variété V2 confirme son apparence phénotypique car elle est la première à manifester un flétrissement, indiquant un niveau de stress plus important par rapport aux autres variétés. Elle présente un CRE le plus bas, contrairement à celui de V5 qui est le plus haut enregistré.

Le CRE permet d'identifier les variétés les plus tolérantes à la sécheresse [34] ;[31].

Les résultats montrent bien une différence génotypique entre les différentes variétés vis-à-vis du déficit hydrique. Cette interaction entre le facteur variété et le facteur stress place dans le groupe des plus tolérantes les variétés V5 et V6 prennent la tête dans ce même groupe. On retrouve la variété V2 à la dernière position avec un contenu relatif de l'ordre de 40%.

3.1.2 Sur la fluorescence chlorophyllienne :

3.1.2.1 Résultats :

Le rendement quantique maximal de la photochimie du PSII (F_v/F_m) a été mesuré dans des segments rectangulaires de feuilles de 2 cm de long pour les 6 variétés d'orge exposées à un déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et au stade tallage. Les résultats sont exposés dans le Tableau 3.8 et illustrés par la Figure 3.2. On peut dès à présent noter que le rendement quantique maximal de la photochimie du PSII (F_v/F_m) a été fortement maintenu pour les 6 variétés en comparaison avec les témoins sous les 2 stades de développement.

Tableau 3.8 : Fluorescence chlorophyllienne mesurée pour les 6 variétés d'orge stressées et témoins, avec application du déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et stade tallage.

Fluorescence (F_v/F_m)								
Variétés	Plantes Non stressées				Plantes stressées			
	Stade 4 feuilles		Stade Tallage		Stade 4 feuilles		Stade Tallage	
	Moyennes	Ecarts type	Moyennes	Ecarts type	Moyennes	Ecarts type	Moyennes	Ecarts type
V1	0.757	0.004	0.7696	0.005	0.745	0.038	0.758	0.001
V2	0.757	0.002	0.7708	0.001	0.739	0.043	0.753	0.008
V3	0.761	0.005	0.7693	0.007	0.741	0.035	0.759	0.001
V4	0.756	0.002	0.7708	0.008	0.737	0.035	0.762	0.001
V5	0.762	0.003	0.7671	0.004	0.751	0.019	0.758	0.017
V6	0.765	0.006	0.7683	0.002	0.750	0.023	0.764	0.001

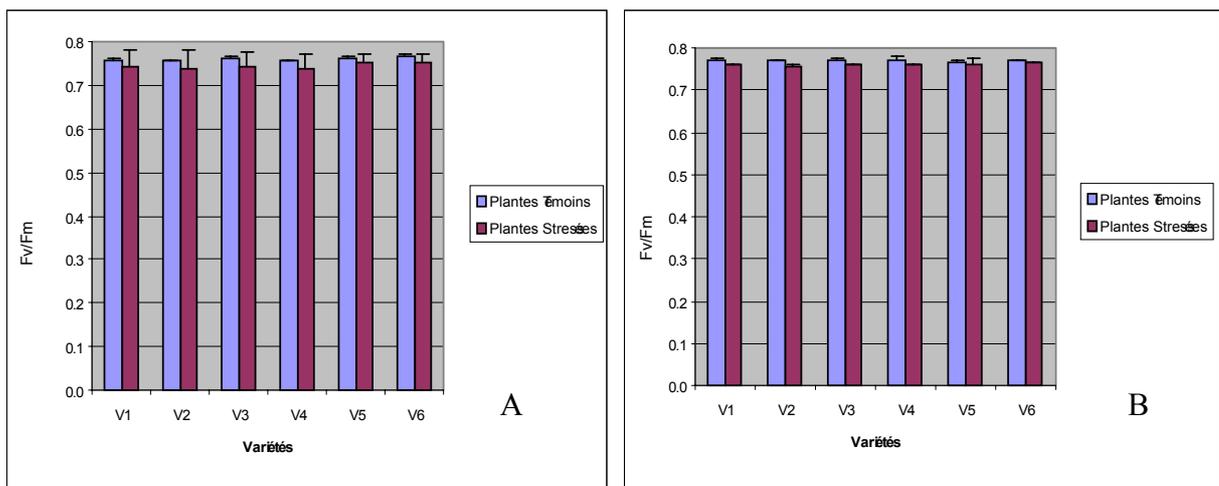


Figure 3.2 : Représentation sous forme d'histogrammes de la fluorescence chlorophyllienne mesurée sur les plantes témoins et les stressées, après un déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et tallage.

A : Stade 4 feuilles. B : Stade tallage.

3.1.2.1.1 Analyse de la Variance :

L'analyse de la variance montre une différence non significative pour toutes les interactions entre les 3 facteurs (variétés stades stress), car ils présentent une probabilité supérieure à $\alpha = 5\%$.

Les 3 facteurs étudiés séparément, montre une différence significative pour le facteur stade de développement et le facteur stress, tandis que le facteur variété ne représente pas une différence significative entre ces traitements (Tableau 3.9).

Tableau 3.9 : Analyse de la variance de la variable la fluorescence chlorophyllienne.

(Fv/Fm)	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0.01	47	0.00				
VAR.FACTEUR 1	0.00	5	0.00	0.15	0.9747		
VAR.FACTEUR 2	0.00	1	0.00	6.24	0.0188		
VAR.FACTEUR 3	0.00	1	0.00	7.11	0.0130		
VAR.INTER F1.2	0.00	5	0.00	0.14	0.9789		
VAR.INTER F1.3	0.00	5	0.00	0.07	0.9900		
VAR.INTER F2.3	0.00	1	0.00	0.36	0.5611		
VAR.INTER F1.2.3	0.00	5	0.00	0.04	0.9900		
VAR.RESIDUELLE 1	0.01	24	0.00			0.02	2.3%

3.1.2.1.2 Test de NEWMAN-KEULS - seuil = 5% :

➤ Facteur Stade :

On remarque d'après les moyennes que le rendement quantique maximal de la photochimie du PSII (Fv/Fm) est plus important au stade 4 feuilles qu'au stade tallage. Cette différence place les deux stades dans deux groupes différents (Tableau 3.10). Donc on peut noter que le stade 4 feuilles présente une plus grande résistance du compartiment PSII au stress hydrique par rapport au stade tallage.

Tableau 3.10 : Moyennes et groupes homogènes du facteur Stade de développement pour la variable fluorescence chlorophyllienne (Fv/Fm).

Stades	Moyennes	Groupes Homogènes
4 Feuilles	0.76	A
Tallage	0.75	B

➤ Facteur Stress :

Les plantes témoins présentent un rendement quantique maximal de la photochimie du PSII (Fv/Fm) supérieur aux plants stressés. Cela met les témoins et les stressées dans deux groupes différents (Tableau 3.11).

Tableau 3.11 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stress pour la variable la fluorescence chlorophyllienne (Fv/Fm).

Stress	Moyennes	Groupes Homogènes
Témoins	0.76	A
Stressées	0.75	B

3.1.2.2 Discussion :

On remarque d'après les résultats de l'analyse statistique que le rendement quantique maximal de la photochimie du PSII (Fv/Fm) ne présente pas de différence entre les 6 variétés, il n'ya pas d'effet génotype. Fv/Fm diminue dans les plantes témoins par rapport aux plantes stressées pour les deux stades développement étudiés. La sénescence des feuilles due à un stress est habituellement accompagnée de l'inhibition des processus photosynthétiques [155], ce qui induit une diminution d'efficacité de PSII [156].

Selon nos résultats les plantes d'orge au stade 4 feuilles semblent résister mieux au déficit hydrique par rapport au stade tallage.

3.1.3 Sur le taux de chlorophylle :

3.1.3.1 Résultats :

Le dosage de la chlorophylle est réalisé après un déficit hydrique de 8 jours pour les deux stades développement (stade 4 feuilles et stade tallage). Les résultats sont exposés dans le Tableau 3.12 et illustrés par la Figure 3.3. La première constatation est que, d'une manière générale les plantes soumises à un manque d'eau présentent un taux de chlorophylle plus bas par rapport aux plantes non stressées pour toutes les variétés et pour les deux stades de développement, à l'exception de la variété V6. Au stade tallage la variété V6 présente un taux de chlorophylle presque identique entre les plants témoins et stressés.

Tableau 3.12 : Taux de chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$) pour les 6 variétés d'orge stressées et témoins, avec une application du déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et stade tallage.

Chlorophylle : ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche)									
Variétés	Plantes Non stressées				Plantes stressées				
	Stade 4 feuilles		Stade Tallage		Stade 4 feuilles		Stade Tallage		
	Moyennes	Ecart type	Moyennes	Ecart type	Moyennes	Ecart type	Moyennes	Ecart type	
V1	12,176	1,091	13,308	2,402	10,572	0,722	12,774	1,176	
V2	15,311	2,845	15,184	0,122	9,826	1,177	13,331	0,231	
V3	17,718	1,586	16,523	1,186	10,704	0,403	15,151	0,398	
V4	13,549	1,055	17,907	0,151	9,569	1,374	14,150	1,099	
V5	15,472	2,820	14,331	2,521	12,208	0,089	13,420	1,985	
V6	12,349	0,013	14,755	0,870	12,463	0,551	13,349	1,004	

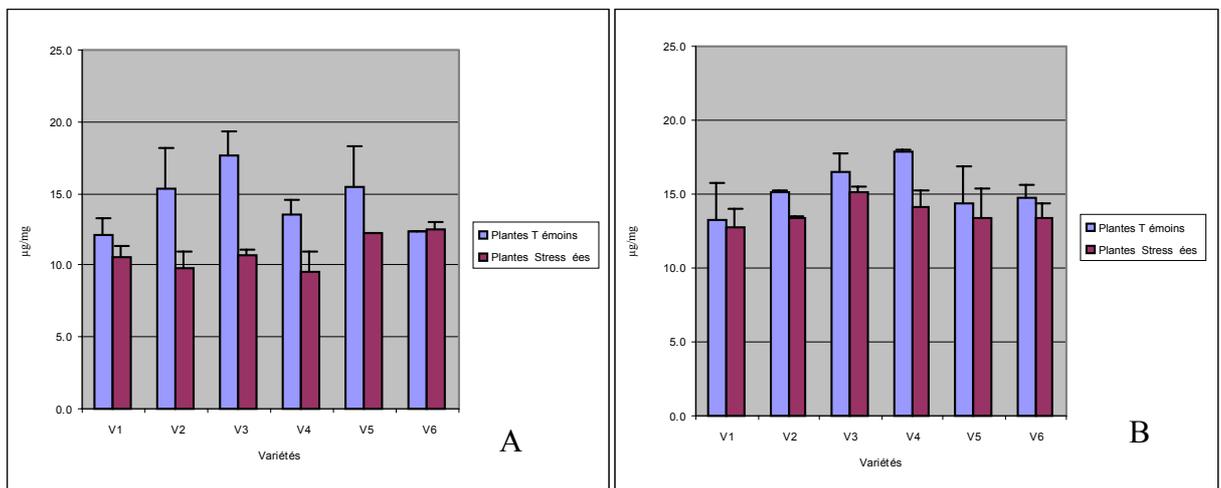


Figure 3.3 : Représentation sous forme d'histogrammes des données concernant le taux de chlorophylle entre les témoins et les stressées, avec un stress de 8 jours au stade 4 feuilles.

A : Stade 4 feuilles. B : Stade tallage.

3.1.3.1.1 Analyse de la variance :

Le tableau d'analyse de variance montre une différence non significative pour l'interaction des 3 facteurs étudiés, la même chose est observée pour l'interaction entre le facteur variété avec le facteur stade de développement et le facteur variété avec le facteur stress. La seule interaction qui présente une différence significative entre les traitements est celle qui regroupe le facteur stade de développement avec le facteur stress (Tableau 3.13). Les trois facteurs pris séparément ont présenté tous, une différence significative. Elle est

même très hautement significative pour le facteur stade de développement et le facteur stress hydrique.

Tableau 3.13 : Analyse de la variance de la variable, le taux de chlorophylle.

Chlorophylle	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	273.95	47	5.83				
VAR.FACTEUR 1	33.94	5	6.79	3.45	0.0172		
VAR.FACTEUR 2	41.32	1	41.32	21.01	0.0002		
VAR.FACTEUR 3	80.43	1	80.43	40.89	0.0000		
VAR.INTER F1.2	20.61	5	4.12	2.10	0.1004		
VAR.INTER F1.3	23.42	5	4.68	2.38	0.0683		
VAR.INTER F2.3	10.83	1	10.83	5.51	0.0262		
VAR.INTER F1.2.3	16.20	5	3.24	1.65	0.1853		
VAR.RESIDUELLE 1	47.20	24	1.97			1.40	10.3%

3.1.3.1.2 Test de NEWMAN-KEULS - seuil = 5% :

➤ Facteur Variété :

La variété V3 présente le taux le plus haut en chlorophylle par rapport aux autres variétés, elle appartient au groupe A (Tableau 3.14), tandis que la variété V1 se retrouve en dernière position dans le groupe B. Les autres variétés appartiennent à un groupe intermédiaire AB avec, la variété V5 présentant la teneur en chlorophylle la plus élevée dans ce groupe.

Tableau 3.14 : Moyennes et groupes homogènes du facteur variété pour la variable, le taux de chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).

Variétés	Moyennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Groupes Homogène
V3	15.02	A
V5	13.86	A B
V4	13.79	A B
V2	13.41	A B
V6	13.23	A B
V1	12.21	B

➤ Facteur Stade :

Le taux de chlorophylle présente une différence entre traitements pour le facteur stade de développement. Le stade tallage présente un taux de chlorophylle le plus élevé en le

plaçant en première position dans le groupe A suivie par le stade 4 feuilles dans le groupe B (Tableau 3.15).

Tableau 3.15 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stade de développement pour la variable le taux de chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).

Stades	Moyennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Groupes Homogène
Tallage	14.52	A
4 Feuilles	12.66	B

➤ Facteur Stress :

L'effet stress joue un rôle important pour cette variable, les plantes stressées présentent un taux de chlorophylle plus bas que les témoins et appartiennent à 2 groupes distincts A et B (Tableau 3.16).

Tableau 3.16 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stress pour la variable le taux de chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).

Stress	Moyennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Groupes Homogène
Témoins	14.88	A
Stress	12.29	B

➤ Interaction Stade-Stress :

Les plantes témoins au stade tallage présentent une moyenne en chlorophylle supérieure aux autres, ce qui les classe ainsi dans le premier groupe A. Les plantes témoins stade 4 feuilles appartiennent eux à un groupe intermédiaire AB. En dernière position, on retrouve les plantes stressées. Ces dernières présentent un taux de chlorophylle plus bas que les témoins.

Les plantes stressées au stade stades tallage se classent dans le groupe B avec un taux de chlorophylle supérieur aux plantes stressées au stade 4 feuille (Tableau 3.17).

Tableau 3.17 : Moyennes et groupes homogènes de l'interaction entre le facteur stade de développement et le facteur stress pour la variable, le taux de chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).

Interaction Stade - Stress	Moyennes($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Groupes Homogènes
Tallage- Témoin	15.33	A
4 Feuilles- Témoin	14.43	AB
Tallage- Stress	13.70	B
4 feuilles- Stress	10.89	C

3.1.3.2 Discussion :

On remarque que le taux de chlorophylle diminue en passant du régime hydrique contrôle (témoins) au déficit hydrique pour les deux stades de développement. Il ya donc un effet stress hydrique, selon [157], la chlorophylle se dégrade graduellement pendant la sénescence des feuilles. On note une relation entre le phénomènes de sécheresse avec ceux liés à la sénescence [158], le manque d'eau pourrait accélérer la perte de la chlorophylle liée à la sénescence.

On peut noter, la présence d'une interaction entre le stade de développement et le facteur stress. Sous condition de déficit hydrique, le stade tallage présente un taux de chlorophylle par matière sèche plus élevé par rapport au stade 4 feuilles.

On peut aussi remarquer la présence d'un effet génotype car ya une différence entre les différents traitements du facteur variété dans le premier groupe. On retrouve dans ce dernier la variété V3, mais l'absence de l'interaction du facteur variété avec le facteur stress hydrique ne permet pas d'avoir un classement des moyennes et de savoir sous déficit hydrique quelle(s)variété(s) ou quel (s) génotype(s) présente le taux le plus élevé et le plus bas de chlorophylle.

3.1.4 Sur le taux de Protéines :

3.1.4.1 Résultats :

Après un déficit hydrique de 8 jours pour les deux stades développement (4 feuilles et tallage), nous avons procédé à un dosage des protéines foliaires totales pour les témoins et les stressées, les résultats sont exposés au tableau 3.18 et illustrés par la Figure 3.4.

Tableau 3.18 : Le taux de Protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche) pour les 6 variétés d'orge stressées et témoins, avec une application du déficit hydrique de 8 jours au stade 4 feuilles et stade tallage.

Protéines. ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche)								
Variétés	Plantes Non stressées				Plantes stressées			
	Stade 4 feuilles		Stade Tallage		Stade 4 feuilles		Stade Tallage	
	Moyennes	Ecart type	Moyennes	Ecart type	Moyennes	Ecart type	Moyennes	Ecart type
V1	143,361	23,220	183,466	50,995	122,389	14,468	128,543	14,100
V2	152,830	10,533	193,207	17,112	92,783	6,897	109,462	8,471
V3	159,834	35,683	132,725	8,611	118,298	23,661	113,458	8,948
V4	143,811	15,314	212,692	13,329	131,000	25,298	113,311	28,169
V5	150,306	30,048	177,989	16,946	132,009	13,412	140,539	0,502
V6	172,955	17,997	190,246	22,011	146,925	17,205	132,595	17,911

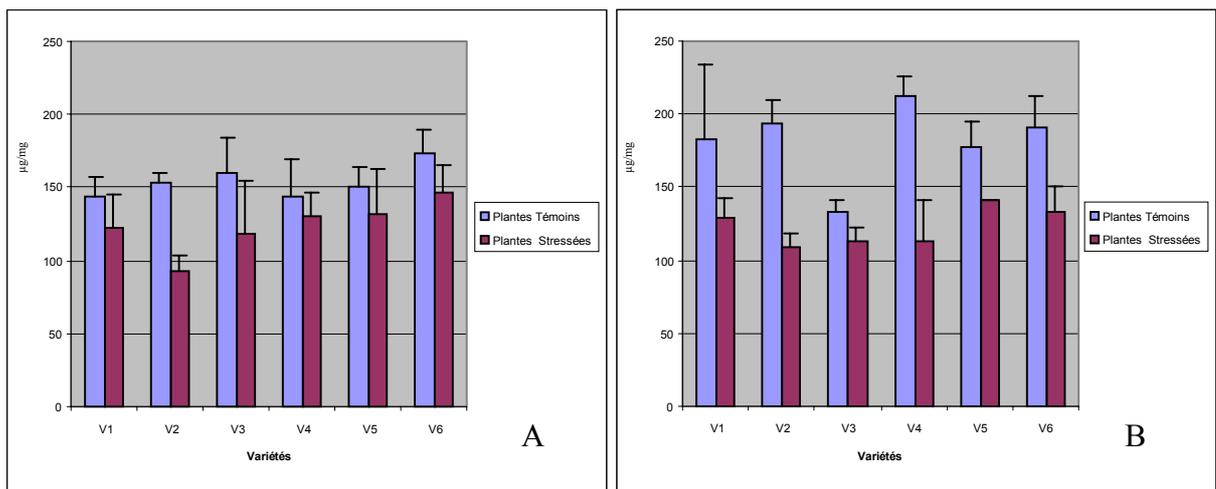


Figure 3.4 : Représentation sous forme d'histogrammes des données concernant le taux de Protéines totales entre les témoins et les stressées, avec un stress de 8 jours au stade 4 feuilles et tallage.

A : Stade 4 feuilles. B : Stade tallage.

3.1.4.1.1 Analyse de la variance :

Aucune différence significative n'est enregistrée pour l'interaction des 3 facteurs étudiés (variétés, stade, stress) avec une probabilité supérieure à 5%. La même chose est observée pour l'interaction entre le facteur variété et le facteur stade de développement, et entre le facteur variété et le facteur stress. Seule l'interaction facteur stade de développement et le facteur stress présente une différence significative (Tableau 3.19). En

reprenant les 3 facteurs individuellement, on note une différence très hautement significative du facteur n°3. Le stade de développement présente aussi une différence significative, tandis que le facteur variété ne présente pas de différence significative entre les 6 variétés étudiées.

Tableau 3.19 : Analyse de la variance de la variable, le taux de Protéines totales.

Protéines totales	S.C.E.	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	52266.29	47	1112.05				
VAR.FACTEUR 1	4438.45	5	887.69	1.99	0.1157		
VAR.FACTEUR 2	2179.64	1	2179.64	4.89	0.0350		
VAR.FACTEUR 3	23594.64	1	23594.64	52.93	0.0000		
VAR.INTER F1.2	2998.64	5	599.73	1.35	0.2792		
VAR.INTER F1.3	2820.18	5	564.04	1.27	0.3109		
VAR.INTER F2.3	2486.34	1	2486.34	5.58	0.0254		
VAR.INTER F1.2.3	3049.32	5	609.86	1.37	0.2708		
VAR.RESIDUELLE 1	10699.08	24	445.80			21.11	14.5%

3.1.4.1.2 Test de NEWMAN-KEULS $\alpha = 5\%$:

➤ Facteur Stade :

La présence d'un effet stade de développement sur le taux de protéine nous permet de classer le stade tallage dans le premier groupe A. Les différentes variétés d'orge présentent tous un taux élevé de protéines au stade tallage supérieur au stade 4 Feuilles (Tableau 3.20).

Tableau 3.20: Moyennes et groupes homogènes du facteur stade de développement pour la variable le taux de protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).

Stades	Moyennes($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Groupes Homogènes
Tallage	152.35	A
4 Feuilles	138.88	B

➤ Facteur Stress :

Toutes les variétés en conditions témoins présentent un taux de protéines plus élevé par rapport aux conditions de manque d'eau (Tableau 3.21).

Tableau 3.21 : Moyennes et groupes homogènes du facteur stress pour la variable le taux de Protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).

Stress	Moyennes($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Groupes Homogènes
Témoins	167.79	A
Stressées	123.44	B

➤ Interaction Stade-Stress :

Cette interaction montre aussi la présence d'une différence entre les plantes témoins du stade tallage avec ceux du stade 4 Feuilles. En condition témoin la croissance de la plante est plus intense au stade tallage ce qui pourrait être reliée à une teneur plus élevée en protéine (Tableau 3.22).

Tableau 3.22 : Moyennes et groupes homogènes de l'interaction entre le facteur stade de développement et le facteur stress pour la variable le taux de Protéines totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matière sèche).

Interaction Stade - Stress	Moyennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Groupes Homogène
Tallage- Témoin	181.72	A
4 Feuilles- Témoin	153.85	B
4 feuilles- Stress	123.90	C
Tallage- Stress	122.98	C

Lorsque les plantes des 6 variétés sont soumises au déficit hydrique, elles présentent le même taux de protéines pour les deux stades de développement, elles se placent ainsi dans le groupe C.

3.1.4.2 Discussion :

Différents travaux ont décrit une augmentation des activités protéolytiques sous déficit hydrique. Cette augmentation est souvent observée pendant le phénomène de sénescence. L'une des caractéristiques de la sénescence est une diminution de la teneur en protéines, ceci même en absence de stress [159] ; [160] .

Lors d'un déficit hydrique subi par les plantes l'activité protéolytique augmente sensiblement ce qui engendre une diminution de la teneur en protéines.

Dans notre essais, on note bien une diminution du taux de protéine chez les stressés par rapport au témoins. Cette diminution n'est pas significativement différente entre les 6 variétés. Nos résultats ne montrent pas un effet génotype pour cette variable.

Le taux de protéine ne présente pas également de différence entre les deux stades de développement étudiés (4 Feuilles et Tallage) sous déficit hydrique. Pour les deux stades, la protéolyse semble être de même intensité. On note toutefois chez les témoins une différence entre les quantités de protéines pour les deux stades de développements, avec une teneur plus élevée pour le stade tallage.

3.1.5 Conclusions :

Les valeurs obtenues pour le contenu relatif en eau (CRE) nous permettent de distinguer les variétés les plus résistantes, car un génotype capable de maintenir un statut hydrique favorable est aussi capable de maintenir une transpiration et une capacité photosynthétique élevée [161]. Dans notre expérimentation sous stress hydrique les variétés répertoriées au catalogue officiel de I.T.G.C., soit V5 et V6, possèdent un CRE le plus élevé par rapport aux autres variétés testées. Le CRE le plus bas est enregistré pour la variété V2, est cela pour les deux stades de développement étudiés.

Les valeurs obtenues pour le rendement quantique maximal de la photochimie du compartiment du PSII (Fv/Fm) montrent une résistance de l'orge d'une manière générale est plus précisément du PSII face à un déficit hydrique. Cette résistance ne dépend pas des variétés, donc il n'ya pas de variation génotypique en les 6 variétés pour ce caractère. Il est à noter que ce paramètre n'est affecté que par des conditions extrêmes de stress qui n'ont probablement pas été atteintes dans nos conditions.

La variable chlorophylle ne montre pas aussi de différence génotypique de l'interaction des 6 variétés avec le facteur stress hydrique. Il est de même pour le taux de protéine. Pour ce dernier il serait intéressant de voir s'il existe une différence entre les variétés en procédant cette fois ci à la séparation entre la fraction soluble et la fraction membranaire. Le stade de développement semble joué un rôle sur la réponse des plantes, et ceci pour toutes les variables étudiées.

Le seul paramètre qui nous a fourni une différence génotypique entre les 6 variétés vis-a-vis du stress hydrique, c'est le CRE. Ce dernier selon plusieurs auteurs nous permet donc d'identifier les variétés les plus tolérantes au stress hydrique. Il serait intéressant de voir la progression du CRE des différentes variétés en condition de manque d'eau hydrique à travers d'autres stades de développements notamment ceux de l'anthèse.

3.2 ETUDE DES PROFILS PROTEIQUE ET IMMUNODETECTIONS :

3.2.1 Etude de la composition protéique foliaire totale :

Les échantillons des six variétés d'orge sont issus de feuilles au stade tallage de plantes soumises à un déficit hydrique progressif par un arrêt de l'arrosage durant 8 jours. Quant aux échantillons témoins ils sont prélevés sur des plantes bien arrosées.

3.2.1.1 Effet du déficit hydrique sur la composition protéique soluble :

L'analyse des gels SDS-PAGE révélés au bleu de Coomassie pour les 6 variétés ne montre aucune différence entre les profils des protéines solubles témoins ainsi que les plantes stressées. On remarque cependant sur les différentes pistes correspondant aux différentes variétés (témoins et stressés) (Figure 3.5), la présence de différentes bandes avec des quantités similaires pour les 6 variétés, que se soit en condition témoin ou en condition de manque d'eau.

Par comparaison avec des gels SDS-PAGE réalisés sur d'autres espèces végétales, on a identifié deux bandes majoritaires correspondant à la grosse sous-unité de la rubisco (située à environ 50kDa) et à la petite sous-unité de la rubisco (à environ 14 kDa).

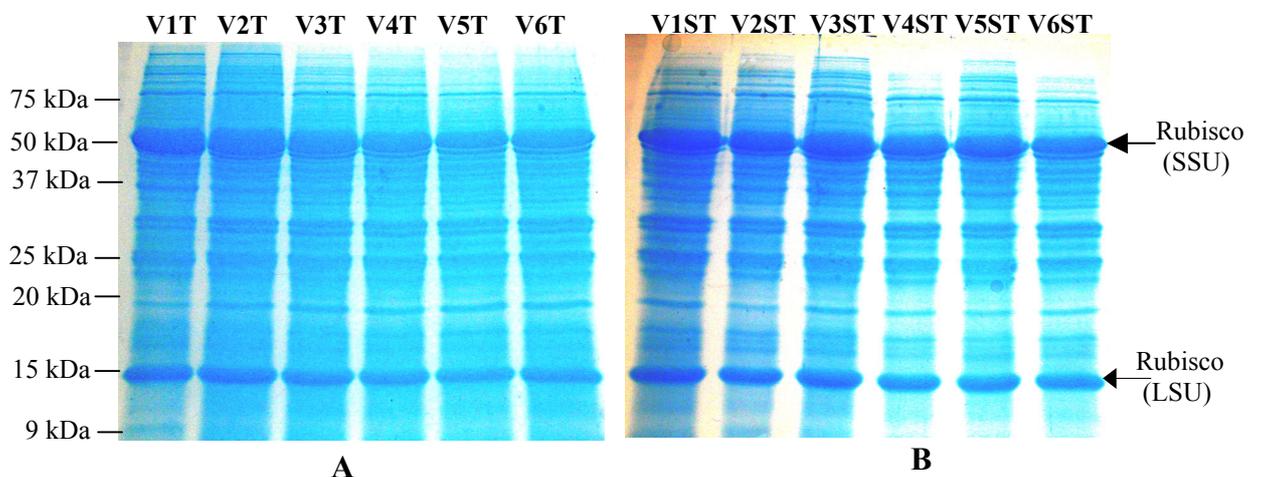


Figure 3.5 : Profils SDS-PAGE révélés au bleu de Coomassie de protéines foliaires solubles de plantes d'orge *Hordeum vulgare* témoins et soumises à un déficit hydrique de 8 jours au stade tallage.

A : Plantes témoins avec 5 μ g de protéines par puits pour V1T, V2T, V3T, V4T, V5T, V6T, qui sont respectivement les variétés (1,2,3,4,5,6) témoins.

B : Plantes stressées avec 5 μ g de protéines par puits V1ST, V2ST, V3ST, V4ST, V5ST, V6ST, qui sont respectivement les variétés (1,2,3,4,5,6) stressées.

(LSU et SSU : grosse et petite sous unités de la Rubisco) .

3.2.1.2 Effet du déficit hydrique sur la composition protéique membranaire :

Les profils SDS-PAGE de protéines membranaires sont présentés dans la Figure 3.6. En utilisant une révélation au bleu de Coomassie aucune différence entre variétés n'a été observée. Toutes les bandes présentent une même intensité, que ce soit pour les plantes témoins ou pour les plantes stressées. Aucune différence variétale n'est observée en condition de stress. Parmi les bandes majoritaires, quelques polypeptides ont pu être identifiés par comparaison avec des gels d'autres variétés. Il s'agit de bandes majoritaires séparées entre 50 et 55 kDa, correspondant aux sous unités α et β des facteurs de couplage du complexe ATPase, tandis que les bandes situées entre 26 et 29 kDa environ, contiennent des polypeptides du complexe des antennes collectrices (LHC).

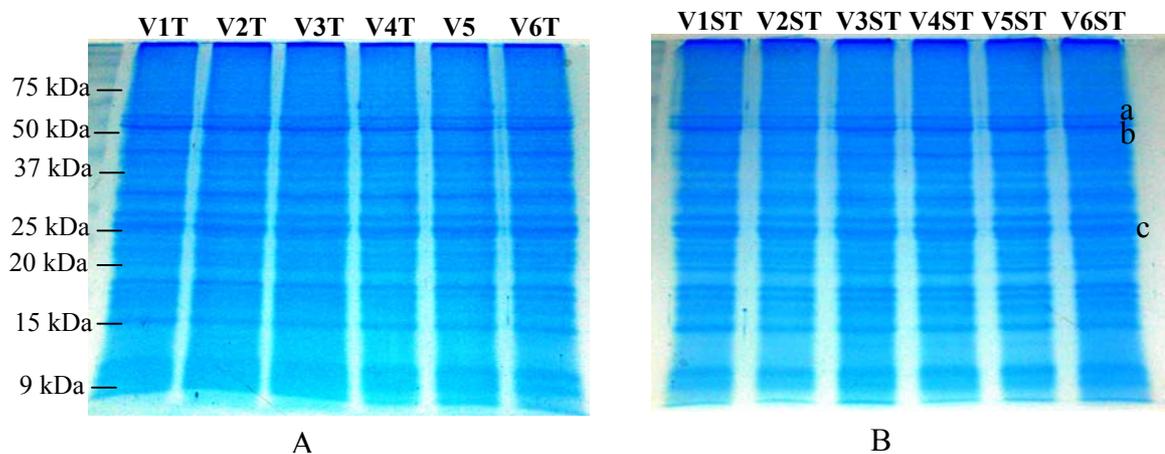


Figure 3.6 : Profils SDS-PAGE révélés au bleu de Coomassie de protéines foliaires membranaires de plantes d'orge *Hordeum vulgare* témoins et soumises à un déficit hydrique de 8 jours au stade tallage. **A :** Plantes témoins avec 5 μ g de protéines par puits pour V1T ,V2T, V3T, V4T, V5T, V6T qui sont respectivement les variétés (1,2,3,4,5,6) témoins.

B : Plantes stressées avec 5 μ g de protéines par puits V1ST ,V2ST, V3ST, V4ST, V5ST, V6ST qui sont respectivement les variétés (1,2,3,4,5,6) stressées.

a et b : sous-unités α et β des facteurs de couplage.

c : polypeptides du complexe LHC des antennes collectrices.

3.2.1.3 Immunodétections avec des anticorps dirigés contre des protéines connues et synthétisées en réponse au stress hydrique :

Nous avons cherché à savoir si des protéines végétales connue pour être synthétisées en condition de stress et pour participer très probablement à des mécanismes de protection contre le stress dans le chloroplaste pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) et d'*Arabidopsis thaliana* sont présentes chez les 6 variétés d'orge. Nous avons également étudié l'abondance de ces protéines. Il s'agit de protéines chloroplastique solubles CDSP 32, BAS1, MsrB2, et la membranaire CDSP 34 identifiée par l'équipe de Pascal REY. Ces protéines sont connues pour être synthétisées en réponse à un stress hydrique et oxydant de façon plus générale. Pour cela nous avons utilisé des anticorps dirigés contres ces polypeptides sur des extraits de feuilles de nos 6 variétés.

3.2.1.3.1 CDSP 32 :

On remarque une différence de quantité de CDSP32, thioredoxine impliquée dans la protection contre le stress oxydant entre les 6 variétés d'orge. Elle est très peu abondante chez la variété V1 et V6, il a fallu plusieurs répétitions pour observer une réaction de l'anticorps au niveau de 32 kDa. Pour cela, il a fallu charger au moins 15µg de protéines pour révéler CDSP32 pour toutes les espèces (Figure 3.7). La protéine CDSP32 ne présente aucune différence nette de quantité entre les plantes stressées et les plantes témoins, ceci pour toutes les variétés. Ces résultats indiquent que CDSP32 ne s'accumule pas se façon notable dans les conditions de déficit hydrique pour nos 6 variétés d'orge.

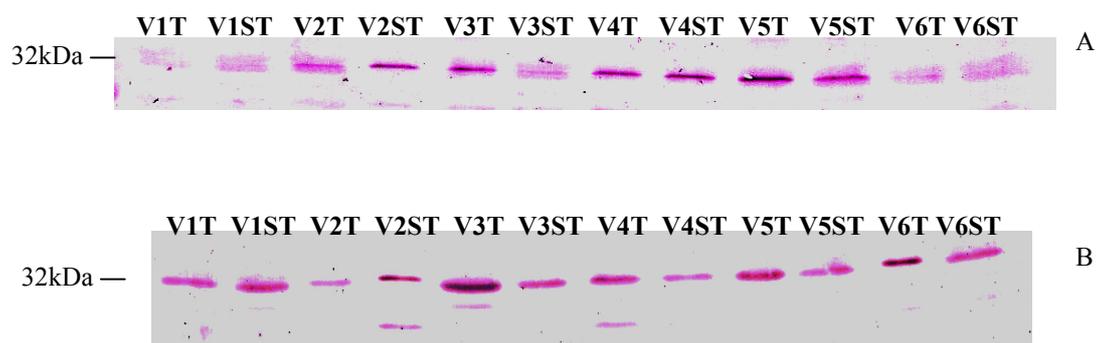


Figure 3.7 : Analyse western des protéines solubles des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP32, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline.

A : Plantes témoins et stressées avec 10µg de protéines par puits.

B : Plantes témoins et stressées avec 15µg de protéines par puits.

V1T ,V2T, V3T, V4T, V5T, V6T qui sont respectivement les variétés (1,2,3,4,5,6) témoins et V1ST ,V2ST, V3ST, V4ST, V5ST, V6ST qui sont respectivement les variétés (1,2,3,4,5,6) stressées

3.2.1.3.2 BAS 1 :

BAS1 est une peroxyredoxine détoxiquant les peroxydes de lipides. Elle est fortement présente chez toutes les variétés. On remarque quelques petites variations de quantités d'accumulation entre les variétés, mais cela n'est pas significatif pour être pris en considération. Il ya pas donc pas de différence réelle qui peut être observée entre les variétés. Les quantités de protéine semblent être constantes quelles que soit les conditions où se trouve la plante (témoin, stressée), ceci pour toute les variétés (Figure 3.8).



Figure 3.8: Analyse western des protéines solubles des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre BAS1, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline.

Plantes témoins et stressées avec 5 µg de protéines par puits. Avec V1T, V2T, V3T, V4T, V5T, V6T qui sont respectivement les variétés (1,2,3,4,5,6) témoins et V1ST, V2ST, V3ST, V4ST, V5ST, V6ST qui sont respectivement (1,2,3,4,5,6) stressées.

3.2.1.3.3 MsrB2 :

Cette protéine répare les protéines oxydées. Elle est présente chez toutes les variétés témoins et stressées, mais avec des quantités différentes selon les variétés. D'une manière générale la protéine présente une abondance plus importante chez les témoins par rapport aux stressées, exceptions faites pour les variétés V6 et V1 (Figure 3.9 et 3.10).

Pour la variété V6 on remarque que la quantité de protéine est faible chez les témoins, mais est beaucoup plus importante chez les plantes stressées. Quant à la variété V1, la protéine est présente chez les plantes témoins, et sa quantité est plus élevée dans les plantes stressées soumise au déficit hydrique.

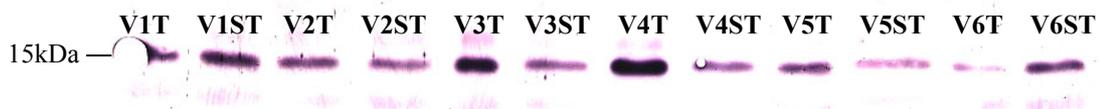


Figure 3.9: Analyse western des protéines Solubles des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre MsrB2, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline.

Plantes témoins et stressées avec 10 µg de protéines par puits. Avec V1T, V2T, V3T, V4T, V5T, V6T qui sont respectivement les Variétés (1,2,3,4,5,6) témoins et V1ST, V2ST, V3ST, V4ST, V5ST, V6ST les variétés (1,2,3,4,5,6) stressées.

La protéine chute chez les plantes tressées avec la plus faible quantité d'accumulation enregistrée chez la variété V2 (Figure 3.10).



Figure 3.10 : Analyse western des protéines membranaires des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre MsrB2, en utilisant une révélation à la peroxydase.

Plantes témoins et stressées avec 15 µg de protéines par puits. Avec V1T ,V2T, V3T, V4T, V5T, V6T qui sont respectivement les Variétés (1,2,3,4,5,6) témoins et V1ST ,V2ST, V3ST, V4ST, V5ST, V6ST les variétés (1,2,3,4,5,6) stressées.

3.2.1.3.4 CDSP 34 :

Cette protéine membranaire est associée aux thylacoïdes, elle est présente chez toutes les variétés, elle est substantiellement accumulée chez les plantes en état de stress, CDSP34 est présente en quantité faible chez les témoins. Elle est fortement synthétisée en état de déficit hydrique (Figure 3.11 et 3.12), ceci pour toutes les variétés.



Figure 3.11 : Analyse western des protéines membranaires des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP34, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline.

Plantes témoins et stressées avec 10 µg de protéines par puits. Avec V1T ,V2T, V3T, V4T, V5T, V6T qui sont respectivement les variétés (1,2,3,4,5,6) témoins et V1ST ,V2ST, V3ST, V4ST, V5ST, V6ST les variétés (1,2,3,4,5,6) stressées.

On note une différence de quantité de CDSP34 entre les variétés en état de stress (Figure 3.12). La variété V6 présente la plus grande quantité de protéine suivie par V2 et V5. Les plus faibles quantité de protéines sont notées respectivement chez les variétés V4, V3 et V1. Notant que V2, variété la plus stressée (mesurée par le CRE), présente un niveau en protéine très important. Cependant, il est important de noter la présence en condition témoin d'une quantité plus importante de CDSP34 dans certaines variétés, dont V5 et V6.

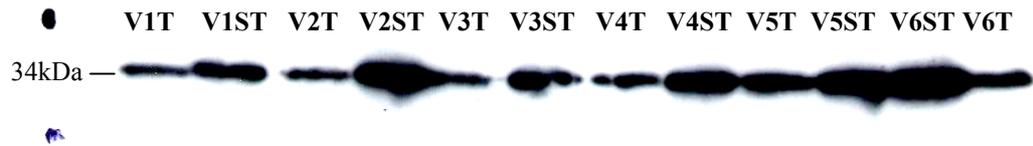


Figure 3.12: Analyse western des protéines membranaires des 6 variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP34, en utilisant une révélation à la peroxydase.

Plantes témoins et stressées avec 15 µg de protéines par puits. Avec V1T, V2T, V3T, V4T, V5T, V6T qui sont respectivement les Variétés (1,2,3,4,5,6) témoins et V1ST, V2ST, V3ST, V4ST, V5ST, V6ST les variétés (1,2,3,4,5,6) stressées.

3.2.2 Discussion :

L'analyse SDS-PAGE des gels au bleu de Coomassie ne permet pas de mettre en évidence des différences entre les variétés sous les deux régimes hydriques (témoin et stressé). Les mêmes profils de bandes avec les même intensités sont observé, pour l'ensemble des variétés.

La protéine soluble CDSP32 selon [162] est codée par le génome nucléaire. L'accumulation de la protéine mise en évidence dans le chloroplaste de plantes soumises à une contrainte hydrique est observée dans les extraits solubles de feuilles. Dans notre expérimentation, la protéine ne présente pas une différence de quantité entre les stressées et les témoins ce qui nous amène à poser des interrogations.

La protéine révélée dans nos blots pourrait être un peptide non apparenté à CDSP32, mais reconnu de façon non spécifique par l'anticorps qui peut reconnaître uniquement une petite partie de la protéine.

Il pourrait aussi s'agir d'une protéine effectivement de type CDSP32, qui chez les monocotylédones ne s'accumulerait pas de la même façon en condition de stress par rapport aux dicotylédones comme la pomme de terre. Elle ne serait pas en tout cas induite dans les conditions de déficit hydrique utilisées car elle est présente sous les deux régimes hydrique (témoin et stressée) dans nos essais et pour toutes les variétés.

Il est à rappeler que chez la pomme de terre la protéine CDSP32 est une thiorédoxine essentielle du système chloroplastique de défense antioxydant en jouant le rôle de donneur d'électrons à BAS1 et à MsrB2 [118].

Dans les chloroplastes, les membranes thylakoïdiennes sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés très sensibles à l'oxydation. La détoxification des lipides hydroperoxydes prend donc une importance majeure, chez la levure et les cellules animales. Les peroxyrédoxines sont réduites par des thiorédoxines [163] ; [164].

BAS1 est une protéine chloroplastique appartenant à la famille des peroxydases thiorédoxine-dépendantes à deux cystéines pour la détoxification des hydroperoxydes de lipides. Il a été mis en évidence la formation d'un complexe disulfure entre CDSP32 et BAS1 [113] ; [114].

L'expression du gène codant pour BAS1 dépend du stade de développement et des conditions redox cellulaires. Les feuilles en développement, peu fonctionnelles du point de vue photosynthétique, ainsi que les jeunes feuilles matures, qui assurent la croissance et le développement de la plante, sont celles qui nécessitent le plus de protection contre les contraintes environnementales. Les enzymes anti-oxydantes sont généralement plus abondantes dans ce type de feuilles, comme cela a été montré par exemple pour la protéine BAS1 [165].

BAS1 exerce une fonction protectrice de l'appareil photosynthétique contre le stress oxydant, et qu'elle s'intègre dans le système chloroplastique de défenses anti-oxydantes [166].

[167] ont constaté que chez l'orge le niveau de transcrit de BAS1 augmente en réponse à un traitement à l'ozone et à la buthionine sulfoximine, et diminue fortement en réponse à l'application d'anti-oxydants tels que le glutathion ou l'acide ascorbique.

Nos essais montrent que BAS1 est présente chez les 6 variétés d'orge en quantité élevée dans les deux régimes hydriques (témoin et stressé) au stade végétatif tallage. La production de cette protéine est maintenue en état de stress et semble ne pas être affectée par le stress dû au manque d'eau.

MsrB2 reçoit du pouvoir réducteur nécessaire à la réduction des méthionines sulfoxydes par la thiorédoxine CDSP32 et permette ainsi la réparation de protéines oxydées.

Selon [168] la protéine est présente sur les feuilles jeunes d'*Arabidopsis thaliana* mai elle est absente dans les feuilles mature sous les deux régimes hydriques (témoin et stressé).

L'accumulation de MsrB2 dans les feuilles d'orge présente une différence entre les 6 variétés. On note une différence génotypique de la synthèse de cette protéine sous les deux régimes hydriques (stressé et témoin). Cette protéine a été isolée chez la pomme de terre, elle est la cible de CDSP32.

En l'occurrence, la quantité de MsrB2 a tendance à diminuer chez les tressées de toutes les variétés avec des proportions différentes. La variété V2 présente la diminution la plus marquée de quantité de protéine tandis que la variété V6 arrive à maintenir le niveau en protéine durant la période de stress.

CDSP34 est codée par le génome nucléaire [162]. Des plantes de tabacs transgéniques sur-exprimant la fibrilline de poivron dans le chloroplaste présentent un développement accru et une floraison plus précoce, par rapport aux plants sauvages, sous des intensités lumineuses élevées [121].

La protéine chloroplastique CDSP34, induite par le déficit hydrique chez la pomme de terre, et supposée être impliquée dans la stabilisation des membranes thylakoïdiennes, s'accumule lors de traitements oxydants [169].

Une augmentation de la quantité de la protéine membranaire CDSP 34 dans les feuilles a été observée en réponse au déficit hydrique pour les 6 variétés d'orge, avec une abondance plus importante chez les variétés V6, V5 et V2. Nous avons constaté la présence de la protéine dans les témoins à des niveaux très inférieurs à celui des stressées. Certaines variétés, dont V5 et V6 se distinguent par une quantité relativement importante de CDSP34 en absence de stress. Cette variance génotypique pourrait être mise en relation avec une tolérance plus marquée de certaines variétés vis à vis du manque d'eau.

La variétés V5 et V6 maintiennent un CRE le plus élevé parmi les 6 variétés sous stress hydrique, alors que la variété V2 présente un CRE le plus bas et au dessous de 40% après 8 jours de stress (Tableau 3.1).

D'après ces résultats on peut formuler l'hypothèse suivante : les variétés les plus tolérantes synthétisent CDSP34 en état hydraté (témoin), mais quand la plante subit un stress, une quantité notable de protéine est déjà présente et pourrait jouer un rôle protecteur. Pour la variété sensible, la protéine est presque absente chez les plantes témoins. La synthèse et l'accumulation de la protéine se produisent plus tardivement quand sont déjà très important.

3.2.3 Etude de la composition protéique chloroplastique de la variété V2 et V4 :

Selon les conclusions de [154], les variétés V4 et V6 donnent un rendement intéressant sous plusieurs types d'environnements, la variété V5 donne un rendement élevé, mais variable quand les conditions deviennent défavorables. En se basant sur ces résultats du terrain, notre choix s'est porté sur la variété cultivée locale V4 comme variété tolérante à la sécheresse plutôt que la V6 qui présente sous déficit hydrique dans notre expérimentation un CRE plus élevé que V4 (Tableau 3.1). Il est à noter que la variété V4 arrive à un même niveau de production que V6 dans les conditions naturelle du terrain.

Nous avons donc poursuivi nos études en ne travaillant plus que sur deux variétés, l'une tolérante (V4), l'autre sensible (V2).

Nous avons concentré nos travaux sur les protéines chloroplastique de ces 2 variétés. Les chloroplastes sont préparés à partir des 2 variétés après un déficit hydrique au stade 4 feuilles pour les plantes stressées.

3.2.3.1 Effet du déficit hydrique sur la composition protéique soluble et membranaire:

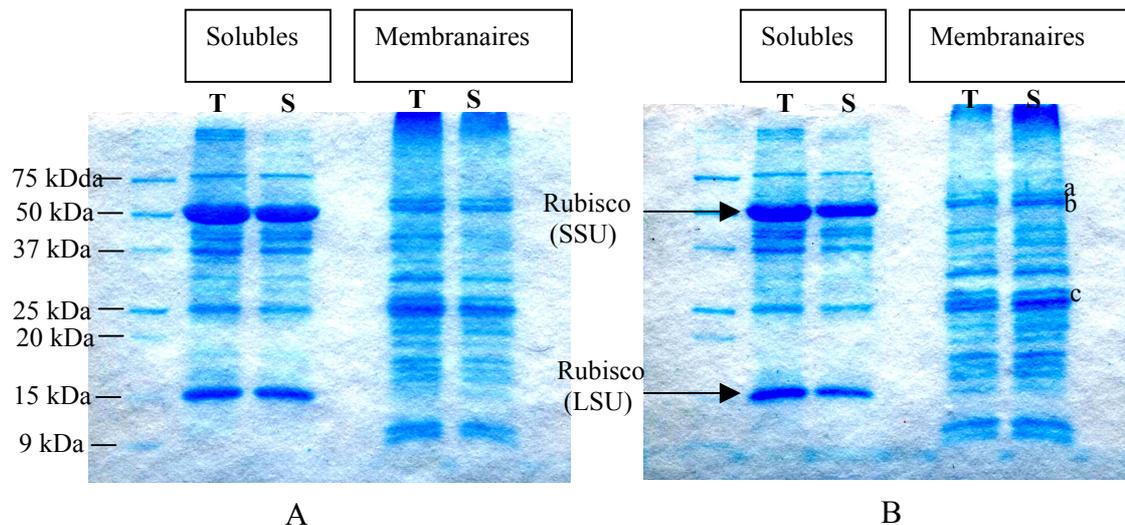


Figure 3.13 : Profils SDS-PAGE révélés au bleu de Coomassie de protéines chloroplastiques solubles et membranaires d'orge au stade 4 feuilles des plants témoins (T) et soumis à un déficit hydrique de 8 jours (S).

A : Variété 2. **B :** Variété 4.

a et b : sous-unités α et β des facteurs de couplage. **c :** polypeptides du complexe LHC des antennes collectrices. **LSU** et **SSU** : grosse et petite sous-unités de la Rubisco).

(20 μ g de protéines par puits).

L'analyse des gels SDS-PAGE révélés au bleu de Coomassie ne montre aucune différence notable entre les profils des protéines solubles et membranaire des plantes témoins et ceux des plantes soumises à un déficit hydrique progressif de 8 jours (Figure 3.13). On note la même distribution des bandes pour les deux variétés sous les deux régimes hydrique (témoin et stressé), que ce soit pour la fraction soluble ou la fraction membranaire. Notons la présence d'une différence d'intensité des bandes entre les témoins et les stressées, surtout pour la variété V4. Cela est dû principalement à la quantité théorique calculée (20µg par puits) qui ne correspond pas à la quantité réelle de protéine chargée dans le puits. Il peut y avoir une mauvaise l'homogénéisation des échantillons de protéines, ceci est d'autant plus observable au niveau de la grosse et petite sous unités de la Rubisco. Ceci nous a amené à faire un rééquilibrage afin de corriger les quantités apportées pour effectuer d'autres analyses (Immunodétection, Electrophorèse bidimensionnelle).

3.2.3.2 Immunodétections des protéines sur membranes :

3.2.3.2.1 CDSP 32 :

La protéine CDSP32 est difficilement détectable même en travaillant directement sur des chloroplastes, on observe tout de même la révélation d'une bande au niveau de 32kDa pour les deux variétés stressées (Figure 3.14). CDSP32 est révélée chez les deux variétés témoins, avec une très faible quantité chez V2. Lors d'un déficit hydrique la protéine CDSP32 est fortement synthétisée chez la variété V2 alors que sa quantité a tendance à diminuer chez la variété V4.



Figure 3.14 : Analyse western des protéines chloroplastiques solubles de deux variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP32, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline.

V2T, V4T respectivement pour les Variétés 2 et 4 témoins.

V2ST, V4ST respectivement pour les variétés 2 et 4 stressées.

(20µg de protéines par puits).

3.2.3.2.2 BAS1 :

La protéine BAS1 est présente chez les deux variétés avec un niveau légèrement supérieur chez la variété V2 par rapport à V4 pour les deux régimes hydriques (témoin et stressé). Aucune différence n'est observée entre les plantes soumises à un déficit hydrique et les plantes témoins pour les deux variétés (Figure 3.15).



Figure 3.15: Analyse western des protéines chloroplastiques solubles de deux variétés d'orge avec le sérum dirigé contre BAS1, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline.

V2T, V4T respectivement pour les Variétés 2 et 4 témoins.

V2ST, V4ST respectivement pour les variétés 2 et 4 stressées.

(20µg de protéines par puits)

3.2.3.2.3 MsrB2 :

La protéine est présente dans les chloroplastes des 2 variétés tout en présentant des différences. Chez la variété V2 la protéine ne présente pas de différence de quantité entre les témoins et les stressées tandis que la variété V4 présente un niveau élevé chez les témoins, mais qui diminue très fortement en état déficit hydrique (Figure 3.16).

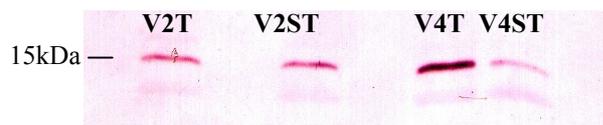


Figure 3.16 : Analyse western des protéines chloroplastiques solubles de deux variétés d'orge avec le sérum dirigé contre MsrB2, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline.

V2T, V4T respectivement pour les Variétés 2 et 4 témoins.

V2ST, V4ST respectivement pour les variétés 2 et 4 stressées.

(20µg de protéines par puits).

3.2.3.2.4 CDSP 34 :

La protéine s'accumule d'une manière notable sous un déficit hydrique chez les 2 variétés (Figure 3.17). La variété V2 présente une abondance de CDSP34 plus élevée que la variété V4 sous déficit hydrique. Quant aux plantes témoins la protéine est très légèrement présente mais en quantité plus importante chez la variété V4.



Figure 3.17 : Analyse western des protéines chloroplastiques solubles de deux variétés d'orge avec le sérum dirigé contre CDSP34, en utilisant une révélation à la phosphatase alcaline.

V2T, V4T respectivement pour les Variétés 2 et 4 témoins.

V2ST, V4ST respectivement pour les variétés 2 et 4 stressées.

(20µg de protéines par puit)

3.2.3.3 Electrophorèse bidimensionnelle :

Afin d'obtenir une meilleure séparation des protéines, des électrophorèses bidimensionnelles ont été réalisées avec une coloration au nitrate d'argent. Nous nous sommes intéressés donc aux effets du déficit hydrique progressif sur les deux fractions des protéines chloroplastiques les plus abondantes : les fractions solubles (stromales) et membranaires (thyroïdiennes).

3.2.3.3.1 Gels bidimensionnels des protéines solubles (stromales) :

La séparation des protéines stromales (15µg) sur gels 2-D pour les deux variétés permet de détecter de nombreux spots ou polypeptides (Figure 3.18 et 3.19). On observe une diminution de quantité et la disparition de plusieurs polypeptides pour les deux variétés lorsqu'elles sont soumises à un déficit hydrique.

L'accumulation de plusieurs polypeptides est clairement mise en évidence chez les stressées.

Le premier polypeptide (\rightarrow) d'environ 70kDa est présent au niveau des deux variétés témoins mais a tendance d'être fortement synthétisé en état de stress chez la variété V4 alors que sa quantité diminue chez la variété V2 en condition de stress.

Un deuxième polypeptide (\rightarrow), n'est pas présent du tout chez les deux variétés témoins V2 et V4, mais il est seulement révélé chez la variété V4 en état de stress hydrique.

Un troisième polypeptide présente une quantité nettement plus élevée lors du stress hydrique pour les deux variétés il est localisé entre 25 et 37 kDa (\rightarrow).

Le quatrième polypeptide identifié est aussi présent chez les témoins. Sa quantité augmente sous stress hydrique chez V4 tandis qu'elle baisse chez V2. Son spot a été localisé au niveau de 20kDa à un pI de l'ordre de 10 (\rightarrow).

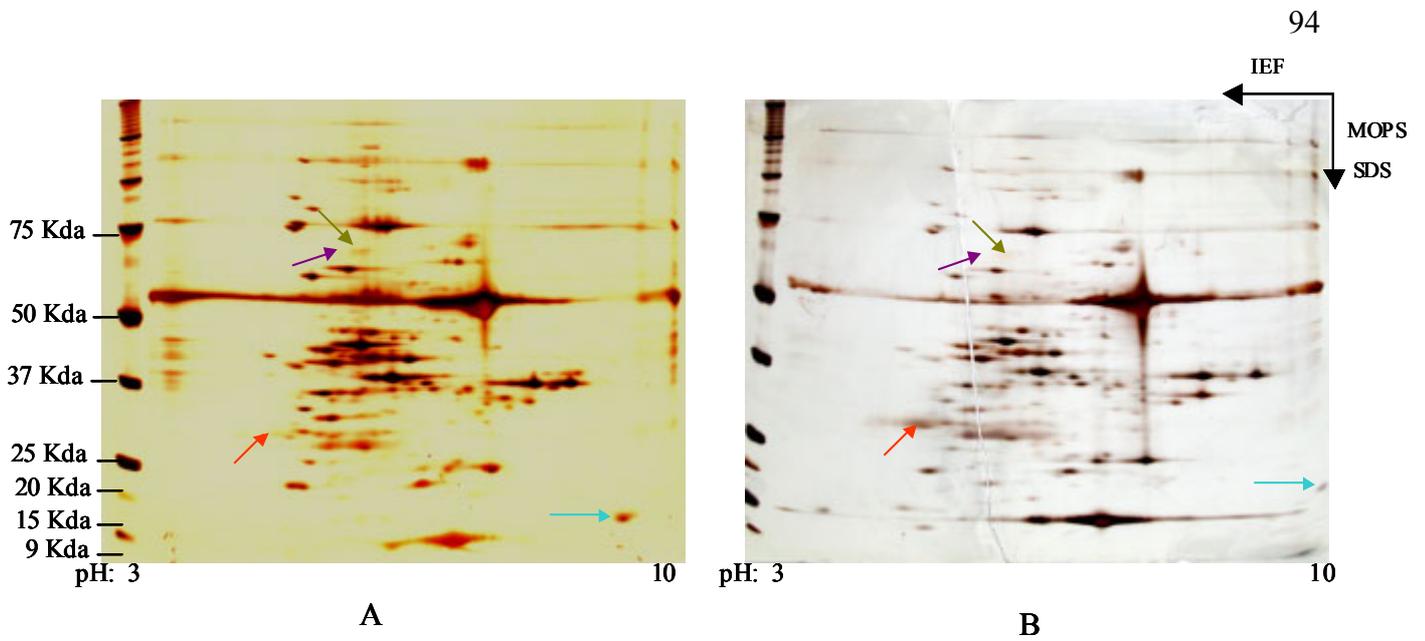


Figure 3.18 : Electrophorèses 2-D de protéines chloroplastiques solubles révélées au nitrate d'argent avec 15 µg de protéines par gel.

A: Variété V2 témoin.

B: Variété V2 stressée.

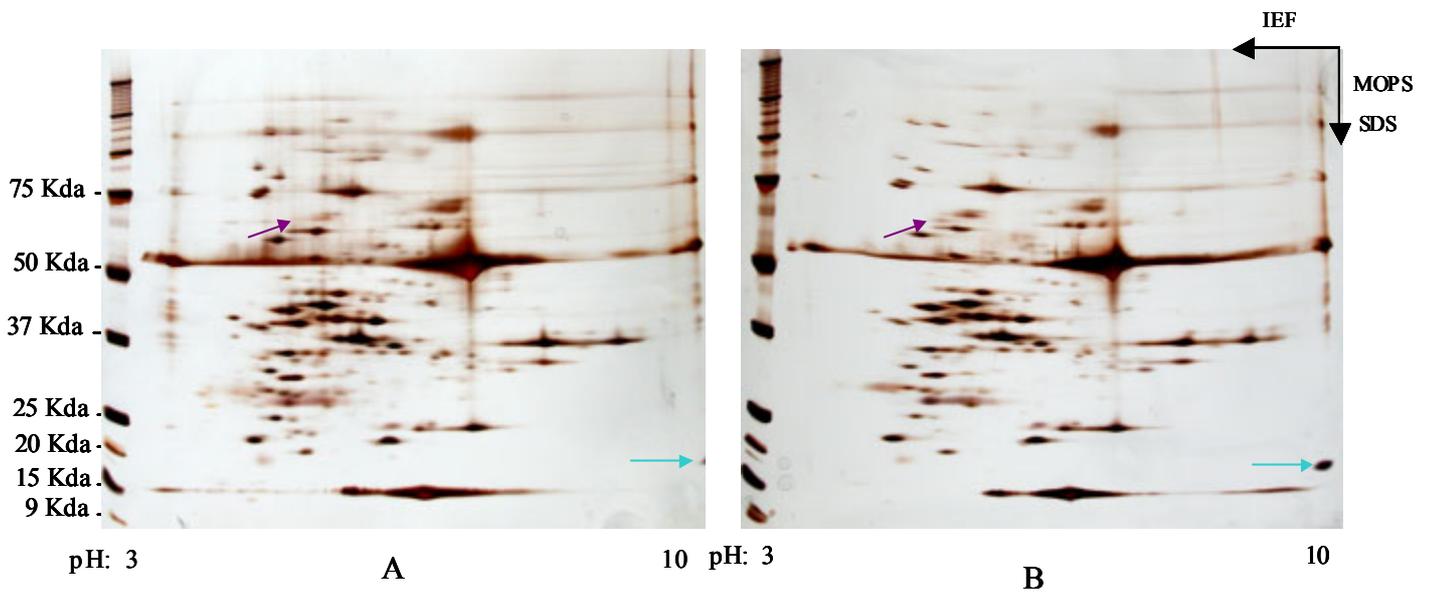


Figure 3.19 : Electrophorèses 2-D de protéines chloroplastiques solubles révélées au nitrate d'argent avec 15 µg de protéines par gel.

A: Variété V4 témoin.

B: Variété V4 stressée.

3.2.3.3.2 Gels bidimensionnels des protéines membranaires (thylacoïdiennes) :

Des électrophorèses 2-D ont été réalisées comme précédemment avec 15µg de protéines. Plusieurs spots sont détectés avec la coloration au nitrate d'argent (Figure 3.20 et 3.21). Un spot au niveau de 32kDa est très faiblement révélé chez les témoins, mais son intensité augmente considérablement chez les plantes stressées des deux variétés. L'abondance de cette protéine est plus élevée chez la variété V2 en condition de stress (→).

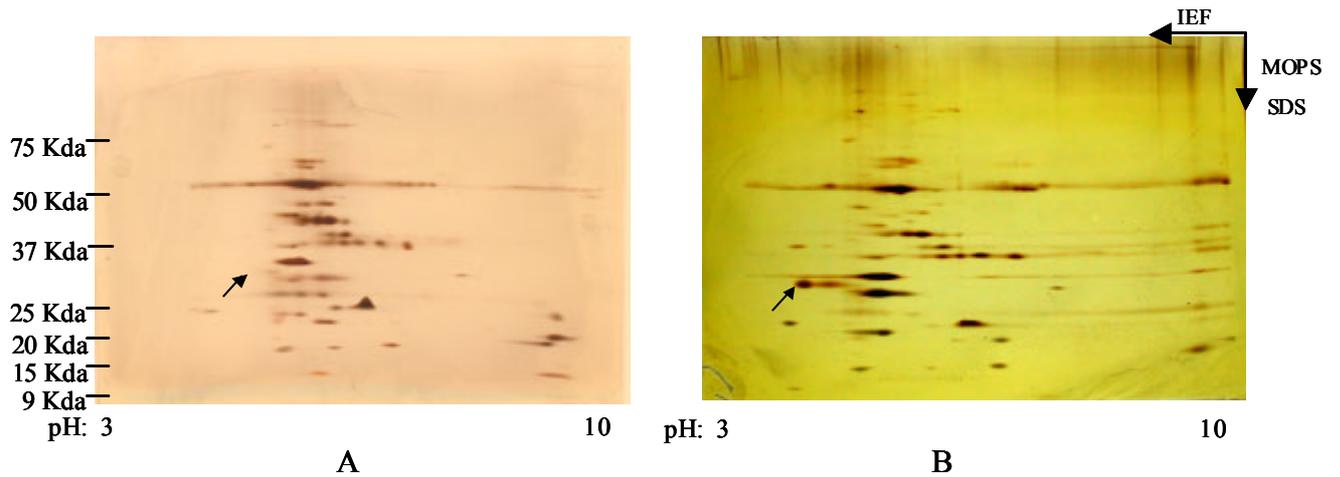


Figure 3.20: Electrophorèses 2-D de protéines chloroplastiques membranaires révélées au nitrate d'argent avec 15µg de protéines par gel.

A: Variété V2 témoin.

B: Variété V2 stressée.

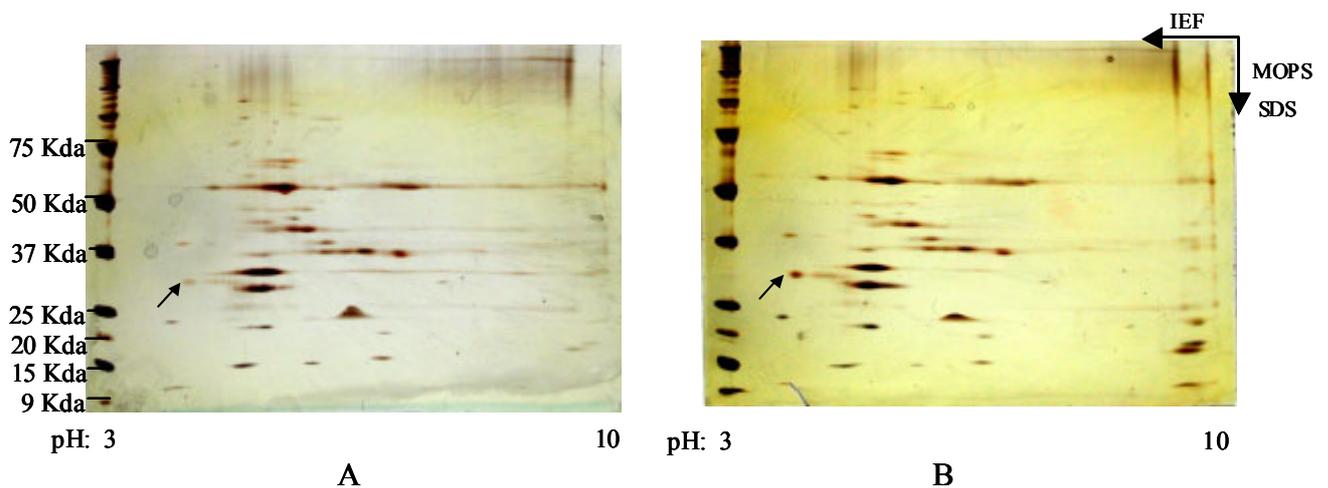


Figure 3.21: Electrophorèses 2-D de protéines chloroplastiques membranaires révélées au nitrate d'argent avec 15µg de protéines par gel.

A: Variété V4 témoin.

B: Variété V4 stressée.

3.2.4 Discussion :

L'analyse SDS-PAGE des gels au bleu de Coomassie réalisée sur les chloroplastes nous permet d'éliminer plusieurs types de protéines dont celles du cytoplasme et des mitochondries. Toute fois cette analyse ne montre toujours pas de différence au niveau des bandes entre les deux variétés sous les deux régimes hydriques. Des immunodétections ont donc été effectuées.

La protéine chloroplastique CDSP 32 est bien présente chez les deux variétés d'orge, chez la variété V2, elle présente les caractéristiques d'une protéine de stress, car sa synthèse est significativement augmentée en condition de stress hydrique. Mais pour V4 on observe une diminution de la quantité de protéine lors d'un déficit hydrique. Notant qu'en utilisant 20µg de protéines chloroplastiques solubles la quantité de protéine révélée est moins importante que celle observée dans les extraits de feuilles (Figure 3.7 et 3.14), cette différence peut être due au facteur stade végétatif, car pour les chloroplastes nous avons travaillé au stade 4 feuilles tandis que pour les protéines foliaires nous avons travaillé au stade tallage, ou tous simplement l'anticorps n'est pas très spécifique, il détecte difficilement CDSP32 chez l'orge, car il a été généré contre une séquence de 20 acide aminés de la protéine de pomme de terre qui est moins conservée peut être chez l'orge.

BAS1 est présente pour les deux variétés et sous les deux régimes hydriques. Cette protéine semble ne pas être affectée lors du stress hydrique, elle reçoit du pouvoir réducteur. Ces observations sont en accord avec celle effectuées pour les échantillons foliaires au stade tallage.

MsrB2 présente une variation de quantité entre les deux variétés, sa quantité semble être relativement faible et identique pour V2 sous les deux régimes hydriques. Chez V4, la concentration de la protéine chez les témoins est élevée, mais elle diminue lorsque les plantes sont soumis au régime hydrique stressée. Ces observations vont dans le même sens que ceux enregistrés avec des échantillons foliaires (Figure 3.9).

Les essais réalisés pour la protéine membranaire CDSP34 donne les mêmes résultats avec les protéines chloroplastiques qu'avec les échantillons foliaires. En travaillant avec un stade de développement différent, cette protéine est aussi fortement exprimée lors du stress hydrique.

L'électrophorèse bidimensionnelle nous a permis de trouver des différences entre la V4 variété dite tolérante à la sécheresse et V2 variété sensible. Notre intérêt s'est porté sur les protéines qui sont plus abondante, en état de stress et plus spécialement celles qui sont absentes chez les témoins.

Pour la fraction soluble, une protéine a été identifiée chez les deux variétés dont leur synthèse a été accentuée lors du stress hydrique par rapport aux témoins. Cette protéine se trouve en dessous de 25 kDa et au voisinage des 28 kDa.

Deux autres protéines solubles voient leur synthèse augmentée sous stress et exclusivement chez V4 la variété tolérante. L'une de ces protéines se trouve au niveau des 70 kDa et l'autre au niveau de 20 kDa. L'identité de ces protéines pourrait être déterminée par isolement des spots correspondants, digestion enzymatique et séquençage des peptides recueillis par spectrométrie de masse.

Une seule protéine membranaire a été identifiée chez les deux variétés. Son accumulation a été observée lors du stress hydrique. Dans les conditions témoins, sa quantité est très inférieure à celle observée chez les stressées, cette protéine est localisée au niveau de 34 kDa ce qui nous fait proposer l'hypothèse qu'il s'agit de la protéine membranaire CDSP34 dont la présence a été confirmée par les blots réalisés avec l'anticorps spécifique (Figure 3.11, 3.12, 3.17).

3.2.5 Conclusions :

Les SDS PAGE des gels au bleu de Coomassie ne peuvent pas montrer de différences sur la composition protéique soluble et membranaire entre les 6 variétés. Que ce soit pour la fraction soluble ou membranaire même en travaillant directement avec des protéines chloroplastiques il n'y a pas de différence significative.

L'analyse d'immunodétection des protéines solubles: la thiorédoxine CDSP32, la peroxyrédoxine BAS1, la méthionine sulfoxyde réductase MsrB2, montre quelles sont toutes présentes chez les 06 variétés avec une variance d'accumulation entre variétés.

La protéine CDSP34 membranaire est aussi présente chez les 6 variétés d'orge. Une augmentation de quantité de CDSP34 a été observée en réponse au déficit hydrique chez les 6 variétés elle est fortement présente chez les plantes stressées et faiblement présente chez toutes les plantes témoins avec tout de même une quantité plus importante chez la variété V6 et V5. Cette quantité notable de protéine chez les plantes témoins pourrait être en relation avec une tolérance plus marquée vis-à-vis du manque d'eau.

Les gels bidimensionnels de protéines chloroplastiques de la fraction soluble et membranaire montrent la présence chez l'orge de protéines à un faible niveau chez les témoins dont la quantité augmente lors d'un stress hydrique. Pour les protéines solubles, notant l'accumulation chez les deux variétés d'une protéine dont le poids moléculaire se retrouve dans la zone des 28 kDa. Deux autres protéines solubles dont leur synthèse augmente spécialement en état de stress ne sont observées que chez la variété V4. La dernière protéine soluble identifiée est une protéine très intéressante, car elle présente les caractéristiques d'une protéine où sa synthèse a lieu strictement sous stress hydrique. En plus cette protéine soluble a été observée uniquement chez la variété tolérante V4 et elle est quasi-absente chez la variété sensible V2. Elle pourrait intervenir dans les mécanismes conférant une plus grande tolérance au déficit hydrique à la variété V4.

Pour la fraction membranaire une seule protéine a pu être observée dont l'accumulation augmente considérablement lors d'un stress hydrique pour les deux variétés. Elle présente un poids moléculaire au voisinage de 34 kDa, il s'agit très probablement de la protéine CDSP34.

D'autres études complémentaires seront nécessaires pour approfondir ce travail afin d'identifier les protéines plus abondantes en condition de déficit hydrique et de déterminer leur fonction potentielle.

CONCLUSION GENERALE

Nos travaux ont montré une variation génotypique pour la variable CRE en condition de déficit hydrique. En effet, le maintien d'un contenu relatif en eau élevé en état de stress hydrique indique aussi un maintien de la transpiration et d'une capacité photosynthétique élevée, ce qui permet de noter que certaines variétés d'orges présente une aptitude à mieux toléré le manque d'eau.

Il serait utile de faire d'autres expérimentations pour étudier le CRE dans les autres stades de développement chez l'orge et notamment ceux rencontrés dans les conditions naturelles sur le terrain.

Parmi les objectifs de ce travail c'est l'identification des protéines susceptibles de s'accumuler dans le chloroplaste en condition de déficit hydrique chez l'orge.

En plus de l'étude des quantités des protéines stromales CDSP32, BAS1, MSRB, et membranaire CDSP34 chez l'orge, nous avons mis en évidence par l'électrophorèse bidimensionnelle et révélation au nitrate d'argent, différentes protéines chloroplastiques s'accumulent en réponse à un déficit hydrique progressif. Quatre protéines de la fraction soluble et une de la fraction membranaire ont été ainsi identifiées.

Il serait intéressant de poursuivre ce travail et de réaliser d'autres électrophorèses bidimensionnelles sur d'autres génotypes parmi eux la variété V6 qui a donné d'excellent résultats pour tous les tests réalisés, et de faire une comparaison avec la variété V4. Ce travail pourrait être réalisé à différents stades de développement afin de voir ainsi l'évolution des différentes protéines identifiées tout au long du cycle de la plante. Ces travaux permettront de sélectionner la protéine, pour une étude plus approfondie.

La connaissance de la structure primaire de chacune des protéines constitue une perspective à court terme essentielle qui débutera par un microséquençage des protéines afin d'obtenir des anticorps polyclonaux elle permettra en plus de préciser des homologies avec des protéines répertoriées dans les banques de données et de proposer un rôle possible par analogie avec des fonctions établies de protéines connues. Pour cela, des ADNC pourront servir de sondes dans le criblage d'une banque d'ADN génomique afin de

déterminer la séquence complète et particulièrement la séquence promotrice. Enfin la production et la caractérisation de plantes transgéniques antisens ou surexpriment les gènes codant pour ces protéines pourrait permettre de préciser l'implication de ces protéines dans la tolérance de l'appareil photosynthétique à la déshydratation.

Les protéines identifiées pouvant être aussi utilisées comme marqueurs de résistance à la sécheresse, si une corrélation positive peut être établie entre leur abondance et la tolérance au manque d'eau. Elles pourraient être alors intégrées comme critère dans des schémas de sélection de variétés possédant un intérêt agronomique.

APPENDICE A
LISTE DES SYMBOLES

ABA :	Acide Abscissique
2-CP :	Peroxyrédoxine A Deux Cystéines
ABRE :	Abcisic Acid Responsive Element
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
APS :	Ammonium Persulfate
ATP :	Adénosine Triphosphate
ATPase :	ATP Synthase
BCA :	Méthode de dosage des protéines par l'acide bicinchonimique.
BCIP :	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphate
BCP	Bacteriferritin Comigratory Protein
BEt :	Bromure D'éthydiium
CDSP et CDSP :	Gène Codant Pour La Protéine CDSP (Chloroplastic Drought-Induced Stress Protein)
chl :	Chlorophylle
COR :	Cold Regulated
CRE :	Contenu Relatif En Eau
CSPD :	Disodium 3-(4-Methoxyspiro[1,2-Dioxetane-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo (3.3.1.1 ^{3,7})Decan]-4-Yl)Phenyl Phosphate
DO :	Densité Optique
DRE :	Dehydration Responsive Element
DSP :	Dessication Stress Protein
DTNB :	Di-Thio-Bis Nitro Benzoic Acid
DTT :	Dithiothréitol
EAO :	Espèces Activées De L'oxygène
ECL :	Electro Chemiluminescent
EDTA :	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ELIP :	Early Light Inducible Protein
F₀ :	Fluorescence Minimale
Fd :	Ferrédoxine
Fm	Niveau Maximum De La Fluorescence
FNR :	Ferrédoxine NADP Réductase
Fo :	Niveau Initiale De La Fluorescence
Fv :	Niveau Stationnaire De La Fluorescence
HSP (lmw, hmw) :	Heat Shock Protein (Low Molecular Weight, High Molecular Weight)
IEF :	Isoélectrofocalisation
Kda :	Kilodalton
MOPS :	Acide 3-(N-Morpholino)Propane Sulfonique
MOPS:	3-(N-Morpholino)Propanesulfonic Acid
PAGE :	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAGE :	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PC :	Plastocyanine

PCR :	Polymerase Chain Reaction
PEG :	Polyéthylène Glycol
Pf :	Poids Frais
pI :	Point Isoélectrique
PI :	Point Isoélectrique
PMSF :	Fluorure De Phényl Méthyl-Sulfone
PQ :	Plastoquinone
Pr	Poids Réhydraté
Prx :	Peroxiredoxin
Ps	Poids Sec
PS I et PS II :	Photosystème I Et Photosystème II
Q_A :	Quinone A
Rubisco :	Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Oxygénase
RuBP :	Ribulose 1,5 Bisphosphate
SDS :	Dodécyl Sulfate De Sodium
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
TBST :	Tris Buffer Saline Tween 20
Temed :	N, N, N', N'-Tétra Méthyl Ethylène Diamine
TR :	Thiorédoxine Réductase
Tricine :	N-Tris [Hydroxyméthyl] Méthylglycine
Tris :	Tris [Hydroxyméthyl] Aminométhane Ou Trizma Base
Trx :	Thiorédoxine
Tween 20 :	Polyoxyéthylène-Sorbitan Monolaurate 20
V t :	Variété Témoin
Vst :	Variété Stressée Par L'application D'un Déficit Hydrique De 8 Jours
Ψ :	Potentiel Hydrique

APPENDICE B
SOLUTION NUTRITIVE DE COÏC ET LESAIN'T

Solution nutritive de Coïc et Lesaint neutrophile à 12 méq d'azote et pH 5,8

SOLUTION A qsp 30 litres (0,3%)

Acide nitrique (d=1,41)	HNO ₃	1895 ml
Di-ammonium hydrogénophosphate	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1200 g
Nitrate de potassium	KNO ₃	2250 g
Oligo-éléments		1000 ml

SOLUTION D'OLIGO-ELEMENTS qsp 1 litre

Ammonium heptamolybdate	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0,5 g
Acide borique	H ₃ BO ₃	15 g
Sulfate de manganèse	MnSO ₄ , H ₂ O	20 g
Sulfate de zinc	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10 g
Sulfate de cuivre	Cu(SO ₄) ₂ , 5H ₂ O	2,5 g

SOLUTION B qsp 30 litres (0,3%)

Acide nitrique (d=1,41)	HNO ₃	5 ml
Nitrate de calcium	Ca(NO ₃) ₂	1600 g
Nitrate de magnésium	Mg(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	900 g
Nitrate de potassium	KNO ₃	2300 g
Acide éthylènediaminetetraacétique Fe-Na	FeNaEDTA	73,4 g

La solution nutritive se compose d'un volume de solution A pour un volume de solution B.

APPENDICE C
COMPOSITION DU TERREAU

Matière sèche	25 % minimum en masse de produit brut
Matière organique	20 % minimum en masse de produit brut
PH eau	6,2
Résistivité	1300 ohm .cm
Capacité de rétention	800 m /l
N azote	70 à 120 mg/l
P ₂ O ₅	60 à 140 mg/l
K ₂ O	200 à 350mg/l

REFERENCES

1. Baldy, C., “Comportement des blés dans les climats méditerranéés”, Écol.Méditerran, V. XII(3-4), (1986) ,73-88.
2. Baldy, G.H ., “Contribution à l’étude fréquentielle des conditions climatiques et de leurs influences sur la production des principales zones céréalières”, Document du projet céréale, (1974) In Bouzerzour.H, Djekoune.A ., Benmahammed.A ., Hassous.L contribution de la biomasse aérienne de l’indice de récolte et de la précocité au rendement en grain de l’orge(H.vulgare L.) en zone semi-aride d’altitude. Cahiers Agri, V.7, n° 4 ,(1998), 307-317.
3. Mouret, J.C ., Conesa A.P ., Bouchier.A ., Gaid, M. et Ould-Said H., “Identification des facteurs de variabilités du rendement du Blé dur en conditions hydriques limitantes dans la région de Sidi-bel-abbès”. Céréaliculture n° 23, (1990), p 1-10.
4. Bonjean, A. et Picard E., “ les céréales à paille origine- histoire - économie- sélection ” Softword/Groupe ITM, (1990),250p.
5. Bouzerzour, H. et Hadj Sahraoui A., “Performances des nouvelle variétés de céréales en milieu producteur”. Document interne FEA Sétif , (1989) , p9
6. Bouzerzour, H. et Monneveux P., “Analyse des facteurs de stabilité du rendement de l’orge dans les conditions des hauts plateaux algériens”, in Séminaire sur la tolérance à la sécheresse. INRA France, Colloques , V.64, (1992), 205- 15.

7. McCue, K.F. et Hanson A.D., “Drought and salt tolerance: towards understanding and application”. *TibTech.*,V.8 (1990), 358-362.
8. Sinon, H., Codaccioni, P., Lecoœur, X ., “ Produire les céréales à paille ”, *Techniques et documentation lavoisier* , (1989), 989-333.
9. Jouve, A.M ., Belghazi, S. et Kheffache Y., “La filière des céréales dans les pays du Maghreb :constante des enjeux, évolution des politiques”. in *Options Méditerranéennes, Les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000 Sér. B / n°14* ,(1995) , 169-189.
10. Baldy C., “Effet du climat sur la croissance et le stress hydrique des blés en méditerranée occidentale. Relationships with osmotical potential, carbon isotope ratio and grain yield”. In *tolérance à la sécheresse des céréales en zones méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale.*(Monneuveux.P. et Bensalem M. eds.). INRA ed., Paris. Colloques 55, (1993), 83-99.
11. El Hafid, R .,Smith, D.H ., Karrou, M ., Samir.K., “ Root and shoot growth, water use and water use efficiency of spring durum wheat under early-season drought”, *Agronomie* ,V.18 (1998) ,181-195.
12. Damania A.B., “ The use of genetic resource in breeding durum wheat”,*Plant Breed.Abst*, V61, (1991),873-881.
13. Boyer J.S., “Plant productivity and environment”,*Science* V.218, (1982), 473-516.
14. Mourard P.H., “Les Cultures Végétales hors sol”,*Publication Agricoles, Agen* ,(1995),78 –86.
15. Turner N.C., “Further progress in crop water relations”, *Advances in Agronomy* V.58, (1997), 293-338.
16. Nobel P.S., “ *Physicochemical and environmental plant physiology*”, 2 edn. San

Dieg (1999), Academic Press.

17. Sheehy J.E., Mitchell P.L., Beerling D.J., Tsukaguchi T., Woodward F.I., “Temperature of rice spikelets: thermal damage and the concept of a thermal burden”, *Agronomie*, V.18, (1998), 449-460.
18. Cowan I.R., “Economics of carbon fixation in higher plants. In: Givnish TJ, ed. *On the economy of plant form and function*”. Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney: Cambridge university press. (1986),133-170.
19. Boyer J.S., “Water transport in plants: mechanism of apparent changes in resistance during absorption”, *Planta*, V.117, (1974), 187-207.
20. Boyer J.S., “Regulation of water movement in whole plants”. In: Jennings HD, ed. *Integration of activity in the higher plant. Symposia of the society for experimental Biology*, V.31, (1977),455-470.
21. Boyer, J.S., “Water transport”, *Annual Review of Plant Physiology* , V.36, (1985), 473-516.
22. Frensch, J., “Primary responses of root and leaf elongation to water deficits in the atmosphere and soil solution”. *Journal of Experimental Botany*, V.48,(1997), 985-999.
23. Passioura, J.B., “Accountability, philosophy and plant physiology”. *Search*, V.10, (1979),347-350.
24. Passioura, J.B., ”Drought and drought tolerance”. In Belhassen E. (eds), *Drought tolerance in higher plants : genetical, physiological and molecular biological analysis*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands”, *Plant Growth Regulation*, V.20, (1996),79-83.
25. Durant, J-H., “Arrêter de désert” Techniques vivante – collection publiée par l’agence de coopération culturelle et technique avec la collaboration du conseil

- international de la langue française - presses universitaire de France, (1988), 416p
26. Dubief, J., "Le climat du Sahara" Tome II , fascicule I – Mémoire hors série – Un .d'Alger – Institut de Recherches Sahariennes – Alger, V.1, (1963), 275 p.
 27. Tardieu, F. et Dreyer, E., "Régulation des échanges gazeux par les plantes soumises à la sécheresse". In l'eau dans l'espace rurale. Production végétale et qualité d'eau.(C.Riou,R.Bonhomme,P.Chassin, A.Neuve,F.Papy.ed.) INRA ed., paris, (1997) 41-59.
 28. Feliachi, K., Améroun, R., khaldoun, A., " Impacte de la sécheresse sur la production des céréales cultivées dans le nord de l'Algérie ". Communication présenté à l'ENSI lors du séminaire portant sur la prévention et assurance des risques climatiques 22-23 juin 1998 in Céréaliculture, n°.35 ,(2001), 28-34.
 29. Levitt, J., "Comparative stress responses" in kozlowski T.T, (eds). Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, Inc, , Madison, Wisconsin,V.2 ,(1980), 533-567
 30. Katerji, N., et Hallaire M., " les grandeurs de référence utilisable dans l'étude de l'alimentation en eau des cultures" . Agronomie,V.4, 1984, 999-1008
 31. Merah, O., " Potential imporatance of water status traits for durum wheat improvement under mediterranean conditions", J. Agricultural Science,V.137, (2001),139-145
 32. Schonfeld, M.P., Richard, J.C., Carver, B.F., et Mornhi, N.W., "Waterrelation in winter wheat as drought resistance indicator". Crop Science , V.28, (1988), 526-531.

33. Winter, S.R., Musick J.T., et Porter, K.B., "Evaluation of screening of techniques for breeding Drought-resistant Winter Wheat". *Crop Science*, V.28, (1988), 512-516.
34. Matin, M.A., Jarvis, H., Brown, H., et Ferguson, H., "Leaf water potential, relative water content, and diffuse resistance as screening techniques for drought resistance in barley", *Agronomy journal* , V.81, (1989),100-1005.
35. Katerji, N., "Les indicateurs de l'état hydrique de la plante". In l'eau dans l'espace rurale. Production végétale et qualité d'eau.(C.Riou,R.Bonhomme,P.Chassin, A.Neveu,F.Papy.éd.), INRA ed., paris, (1997),169- 177.
36. Hsiao, T.C., "Plant responses to water stress". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, V.24 , (1973) ,519-570
37. Taiz, L., Zeiger, E., "Plant Physiology. The Benjamin Cummings publishing Company, Inc., California", , Stress physiology, chapter14, (1991), 346-370 Photosynthesis : the light reactions and carbon metabolism, chapter 8 and 9, (1991),179- 248 Ethylene and abscisic acid , chapter 19, (1991), 473-489.
38. Schuppler, U., He, P.H., John P.C.L. et Munns, R., "Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle kinase activity in wheat leaves", *Plant Physiol.*,V.117, (1998), 665-678.
39. Kaiser, W.M., "Effects of water deficit on photosynthetic capacity". *Physiol. Plant.*, V.71 ,(1987), 142-149.
40. Kaiser, W.M., Schröppel-Meier, G., Wirth, E., "Enzyme activities in an artificial stroma medium", *Planta*, V.167, (1986), 292-299.

41. Sharkey, T. D., Loreto, F., et Vasey, T.L., "Effet of stress on photosynthesis". In Baltscheffsky M., (Eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, Current Research in Photosynthesis, V.4, (1990) ,549-556.
42. Luna, M., Badiani, M., Felici, M., Artemi, F. et Sermanni, G., "Selective enzyme inactivation under water stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings". *Envir. Exper. Bot.*, V.25,n°2, (1985) , 153-156.
43. Mudgett, M.B. et Clarke S., "Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat". *J. Biol. Chem.*,V.269 , (1994) , 25605-25612.
44. Bray, E.A., "Molecular responses to water deficit" .*Plant Physiol.*, V.103, (1993),1035-1040.
45. Smirnoff, N., "The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication". *New Phytol*,V.125, (1993), 27-58.
46. Stadtman, E.R., "Metal ion-catalyzed oxidation of proteins : biochemical mechanism and biological consequences", *Free Rad. Biol. & Med.*, V.9, (1990), 315-325.
47. Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla S.,Klucas, R.V. et Aparicio-Tejo P., "Drought induce oxidative stress in pae plants".*Planta*, V.194 ,(1994),346-352.
48. Wallace, S.S., "Oxidative damage to DNA and its repair. In Scandalios J. C. (Eds), *Oxidative stress and molecular biology of antioxydant defenses*", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1997),49-90.
49. Ingram, J. et Bartels, D., "The molecular basis of dehydration tolerance in plants". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, V.47, (1996), 377-403.

50. Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F. et Izzo R., “Lipid changes in maize seedlings in response to field water deficits”. *J. Exp. Bot.*, V.40, n°215, (1989), 675-680.
51. Ferrari-Iliou, R., Thi, A. T. P. et Da Silva J. V., “Effects of water stress on the lipid and fatty acid composition of cotton (*Gossypium hirsutum*) chloroplasts”. *Physiol. Plant.*, V.62, (1984), 219-224.
52. Meyer, S., Hung, S. P. N., Trémolières, A., de Kouchkovsky, Y., “Energy coupling, membrane lipids and structure of thylakoids of Lupin plants submitted to water stress”. *Photosynthesis Res.*, V.32, (1992), 95-107.
53. Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Melfi D. et Izzo R., “Lipid composition of plasma membranes isolated from sunflower seedlings grown under water-stress”. *Physiol. Plant.*, V.87, (1993), 508-514.
54. Kappus, H., “Lipid peroxydation : mechanisms, analyses, enzymology and biological relevance”. In Sies H., (Eds), *Oxidative stress*, Academic Press, New-York, (1985), 273-310.
55. Plaut, Z. et Federman, E., “Acclimation of CO₂ assimilation in cotton leaves to water stress and salinity”. *Plant Physiol.*, V.97, (1991), 515-522.
56. Chaves, M.M., “Effects of water deficits on carbon assimilation”. *J. Exp. Bot.*, V.42, (1991), 1-16.
57. Tourneux, C. et Peltier G., “Effects of water deficit on photosynthetic oxygen exchange, measured using ¹⁸O₂ and mass spectrometry in *Solanum tuberosum* L. leaf discs”, *Planta*, V.195, (1995), 570-577.
58. Havaux, M., “Stress tolerance of photosystem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat and photoinhibition stresses”, *Plant Physiol.*, V.100, (1992), 424-432.
59. Havaux, M., “La fluorescence de la chlorophylle in vivo : Quelques concepts appliqués à l'étude de la résistance de photosynthèse aux contraintes de

- l'environnement", in : Tolérance à la Sécheresse des Céréales en Zone Méditerranéenne. Diversité Génétique et Amélioration Variétale, Montpellier (France), 15-17 décembre 1992. Les Colloques de l'INRA ,N° 64 , (1993),19-29.
60. Whatley, J.M., " The endosymbiotic origin of chloroplasts", Int. Rev. Cytol. V144, (1993), 259-299.
 61. Lawlor, D.W., "Photosynthesis: metabolism, control and physiology", Longman Group Limited, Longman Singapore Publishers Ltd., Singapore, (1987),262p
 62. Robet, D. et Roland J-C., "Caractéristique et stratégie évolutive des plantes .organisation cellulaire", Biologie végétale, Doin Initiative Santé (2^e édition) France , V. 1, (1998), p367.
 63. Graan, T. et Boyer J.S., "Very high CO₂ partially restores photosynthesis in sunflower at low water potentiel". Planta, V.181, (1990), 378-384.
 64. Mehler, A.H., " Studies of reactivity of illuminated chloroplasts. I Mechanism of reduction of oxygen and other Hill reagents ". Arch. Biochem. Biophys, V. 33, (1951), 65-77.
 65. Ireland, C.R., Baker, NR. et Long, S.P., " The role of carbon dioxide and oxygen in determining chlorophyll fluorescence quenching during leaf development ". Planta ,V.165, (1985) , 477-485.
 66. Durrant, JR., Giorgi, LB., Barber, J., Klug, DR. et Porter, G., "Characterization of triplet states in isolated photosystem II reaction center : oxygen quenching as a mechanism for photodamage ". Biochim. Biophys. Acta, V.1017, (1990) ,167-175.
 67. Monneveux, P. et Belhassen, E. "The diversity of drought adaptation in the wide". In Belhassen E. (eds), Drought tolerance in higher plants : genetical,

- physiological and molecular biological analysis, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Plant Growth Regulation, V.20, (1996) ,85-92.
68. Cushman, J. C. et Bohnert, H. J., “Molecular genetics of Crassulacean Acid Metabolism”. Plant Physiol., V.113 , (1997), 667-676.
 69. Bazzaz, F., et Sombroek, W., “L’énigme: Changement de climat – agriculture” in Changements du climat et production agricole,FAO, rome, italie publié par l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et polytechnica paris (1997),p11.
 70. Monneveux, P., This, D. et Belhassen, E., “ Amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse”, (1997), 121-142. In l’eau dans l’espace rurale. Production végétale et qualité d’eau.(C.Riou,R.Bonhomme,P.Chassin, A.Neveu,F.Papy.éd.), INRA ed., paris 411p.
 71. Turner, N.C., “Drought resistance and adaptation to water deficits in crops plants”. Dans Stress Physiology in Crop Plants, Mussell, H. et Staples, R.C. (éds). Wiley Intersciences, New York, (1979), pp. 303-372.
 72. Passiourra, J.B., “Grain yield, harvest index and water use in wheat”, J.Aust .Inst.Agri.Sci, V.43, (1977),117-120.
 73. May, L., Het Milthorpe, F.L., ” Drought resistance of crop plants”, Field Crop Abstr, V.15, (1962), 171-179.
 74. Jones, M.M., Turner, N.C., et Osmond, C.B, ”Mechanisms of drought tolerance”, In The physiology and biochemistry of drought resistance in plants,Acafemie (L.G Paleg. D.Asppinall.éds), Academie press (1981),15 –37.
 75. Blum, A., “Plante breeding for stress environments”,CRC Press eds, (1988), 223.
 76. Turner, N.C., “Adaptation to water deficits : A changing perspective”. J. Plant Physiol., V.13 ,(1986),175-190.

77. Merah, O., "Utilisation de la discrimination isotopique du carbone pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez le blé dur dans les régions méditerranéennes". Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. 1999, 172p
78. Blum, A., et Ebercon, A., "Cell membrane stability as measure of drought and heat tolerance in wheat", *Crop Sci.*, V.21, (1981), 43-47.
79. Sullivan, C.Y. et Ross, W.M., "Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum. Dans *Stress Physiology*" in *Crop Plants*, Mussell, H. et Staples, R.C. (éds). Wiley Intersciences, New York, (1979), 236-281.
80. Morgen, J.M., "Physiological traits for drought tolerance". in *Drought Resistance in Cereals*, Baker, F.W.G. (éd.). CAB Int., Wallingford, (1989),53-64.
81. Fussel, L.K., Bidinger, F.R., et Bieler, P., "Crop physiology and breeding for drought tolerance Research and development", *Field Crop Res.*, V.27, (1991) ,183-199.
82. Bohnert, H. J. et Jensen R.G., " Strategies for engineering water-stress tolerance in plants". *Tib Tech.*, V.14, (1996) ,89-97.
83. Samaras, Y., Bressan, R.A., Csonka, L.N., Garcia-Rios, M.G., D'Urzo, M.P. et Rhodes, D., "Proline accumulation during drought and salinity", In Davies W. J., (Eds), Smirnoff N., *Environment and plant metabolism, flexibility and acclimatation*, Bios Scientific Publishers, Oxford, (1995), 161-187.
84. Delauney, A. J. et Verma, D. P. S., "Proline biosynthesis and osmoregulation in plants". *Plant J.*, V.4, n°2, (1993), 215-223.

85. Verbruggen, N., Villarroel, R., Van Montagu, M., “ Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana* ”. *Plant Physiol.*, 103 , (1993), 771-781
86. Sundaresan, S. et Sudhakaran P.R., “Water stress-inducible alterations in the proline metabolism of drought-susceptible and -tolerant cassava (*Manihot esculenta*) cultivars”, *Physiol. Plant*, V.94 , (1995), 635-642.
87. Hanson, A.D., “Accumulation of quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds”. In Close T. J. and Bray E. A., (Eds), *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. University of California, Rockville MD, USA, (1993) , 30-36.
88. Hanson A.D., Rivoal J., Burnet M. et Rathinasabapathi B., “Biosynthesis of quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in response to water deficit”. In Davies W. J., (Eds), Smirnoff N., *Environment and plant metabolism, flexibility and acclimatation*, Bios Scientific Publishers, Oxford, (1995), pp 189-198.
89. Robinson, S.P. et Jones, G.P., “Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress”, *Plant Physiol.*, V.13, (1986), 659-668.
90. Brouquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C.F., Hanson, A.D., “Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma”. *Plant Physiol.*, V.90 ,(1989), 322-329.
91. Hayashi, H., Alia Mustardy, L., Deshnum, P., Ida, M. et Murata, N., “Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *codA* gene for choline oxidase ; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress”. *Plant J.*, V.12, n°1, (1997) ,133-142.

92. Rhodes. et Hanson., “ Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants”. *Annu Rev Plant Physiol*, V.44,(1993), 357-384.
93. Adams, P., Thomas, J.C., Vernon, D.M., bohnert, H.J., Jensen, R.G., “Distinct cellular and organismic reponse to sal stress”, *Plant cell Physiol* V.33, n° 8, (1992),1215-1223.
94. Popp, M. et Smirnoff, N., “Polyol accumulation and metabolism during water deficit. In Davies W. J., (Eds), Smirnoff N., *Environment and plant metabolism, flexibility and acclimatation*”, Bios Scientific Publishers, Oxford, (1995) ,129-160.
95. Bonhert, H.J., Nelson, D.E. et Jensen, R.G., “Adaptations to environmental stresses”. *Plant Cell*, V.7, (1995) ,1099-1111.
96. Loewus, FA., Loewus, M.W., “Myo-inositol :its biosynthesis and metabolism”, *Annu Rev plant Physiol*, V.34, (1983),137-162.
97. Santarius K.A., “The protective effects of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance”. *Planta* ., V.113, (1973), 105-114.
98. Matters G.L., Scandalios J.G., “Changes in plant gene expression during stress”, *Devel Gen*,V.7, (1986),167-175.
99. Baker J., Steele, C. et Dure, III.L., “Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton”. *Plant Mol. Biol.*,V.11,(1988) ,277-291.
100. Dure, III.L., “A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation”. *Plant J.*, V.3, (1993 a) 363-369.
101. Dure, III.L., “Structural motifs in LEA proteins”. In TJ Close, EA Bray, eds, *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. The

American Society of Plant Physiologists, University of California, Rockville MD, USA, (1993 b) ,pp 91-103.

102. Goday, A., Jensen, A.B., Cuiñan-Machia F.A., Alba, M.M., Figueras, M., Serratos J., Torrent, M. et Pages, M., “The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals”. *Plant Cell*, V.6,(1994),351-360.
103. Schneider, K., Wells, B., Schmelzer, E., Salamini, F. et Bartels, D., “Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst”, *Planta*, V.189, (1993) ,120-131.
104. Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.H.D. et Wu, R., “Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice”, *Plant Physiol.*, V.110, (1996), 249-257.
105. Piatkowski, D., Schneider, K., Salamini, F. et Bartels, D., “Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes”, *Plant Physiol*, V.94 , (1990), 1682-1688.
106. Bartels, D., Hanke, C., Schneider, K., Michel, D. et Salamini, F., “A desiccation-related Elip-like gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA”. *EMBO J.*, V.11,(1992), 2771-2778.
107. Bartels, D., Alexander, R., Schneider, K., Elster, R., Velasco, R., Alamillo, J., Bianchi, G., Nelson, D. et Salamini, F., “Desiccation-related gene products analyzed in a resurrection plant and in barley embryos ”. In Close T.J et Bray E. A., (Eds), *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*, the American Society of Plant Physiologists, University of California, Rockville MD, USA, (1993) ,119-127

108. Pruvot, G., Cui n , S., Peltier, G., et Rey, P., "Characterisation of a novel drought-induced 34-kDa protein located in the thylakoids of *Solanum tuberosum* L", plants. *Planta*, V.198, (1996a) ,471-479.
109. Pruvot, G., Massimino, J., Peltier, G. et Rey, P., "Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins" in *Solanum tuberosum* L. *Physiol. Plant*, V.97 , (1996b), 123-131.
110. Rey, P., Pruvot, G., Becuwe, N., Eymery, F., Rumeau, D. et Peltier, G., "A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L" plants. *Plant J.*, V13 ,(1998), 97-107.
111. Eklund, H., Gleason, F.K., Holmgren, A., "Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins*", V11, (1991), 13-28.
112. Ruelland, E., Miginiac-Maslow, M., "Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins : activation or relief from inhibition?", *Trends Plant Sci*, V.4, (1999),136-141.
113. Broin, M., Cui n , S., Eymery, F. et Rey, P., "The plastidic 2 for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage", *Plant cell*,V.14, (2002),1417-1432.
114. Broin, M., et Rey, P., "Potato plants lacking the CDSP32 plastidic thioredoxin exhibit overoxidation of the BS1 2-Cysteine peroxiredoxin and increased lipid peroxidation in thylacoids under photooxidative stress", *Plant Physiol.*, V.132, (2003), 1335-1343.
115. Baier, M., Dietz, K-J., "Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases", *Plant Mol. Biol.*,V.31, (1996), 553-564.

116. Cheong, N.E., Choi, Y.O., Lee, K.O., Kim, W.Y., Jung, B.G., Chi, Y.H., Jeong, J.S., Kim, K., Cho, M.J., Lee, S.Y., “Molecular cloning, expression, and functional characterization of a 2cys-peroxyredoxin in Chinese cabbage” *Plant Mol. Biol*, V.40, (1999), 825-834.
117. Genot, G., Wintz, H., Houlné, G., Jamet, E., “Molecular characterization of a bean chloroplastic 2-Cys peroxyredoxin”, *Plant Physiol. Biochem*, V.39, (2001), 449-459.
118. Rey, P., Cuiné, S., Eymery, F., Garin, J., Cour, M., Jacquot, J.P., Rouhier, N et Broin, M., “Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses”. *The Plant Journal*, V.41, (2005), 31-42.
119. Gillet, B., “Caractérisation moléculaire de CDSP 34 protéine induite par déficit hydrique chez *Solanum tuberosum* L . implication potentielle dans la protection des thylacoïdes lors de contraintes environnementales” .Thèse de doctorat de l’institut national agronomique Paris –Grignon , (1998) , 130 p .
120. Gillet, B., Beyly, A., Peltier, G., Rey P., “Molecular characterization of CDSP34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants and regulation of CDSP34 expression by ABA and high illumination”. *Plant J*. V.16, (1998), 257-262.
121. Rey, P., Gillet, B., Römer, S., Eymery, F., Massimino, J., Peltier, G., Kuntz M., “ Over-expression of a bell pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and in plant development upon stress”, *Plant J*, V. 21, (2000), 483-494.

122. Maurel, C., "Aquaporins and water permeability of plant membranes". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, V48, (1997), 399-429
123. Thomas, T. L. et Stoddart, J.L., "Leaf senescence". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, V.31, (1980), 83-111
124. Reviron, M.P., Vartanian, N., Sallantin, M., Huet, J-C., Pernollet, J-C. et de Vienne D., "Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves". *Plant Physiol*, V.100, (1992), 1486-1493
125. Downing, W. L., Mauxion, F., Fauvarque, M.O., Reviron, M.P., de Vienne, D., Vartanian, V. et Giraudat, J., "A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds". *Plant J.*, 2,(5), (1992), 685-693.
126. Nespoulos, C., Ilami, G., Huet, J-C., Vartanian, N. et Pernollet, J-C., "Purification and structural characterization of Bnd22, a drought induced protein in *Brassica napus* leaves". In Pech J-C., Latche A., Bouzayen M., (Eds), *Plant Sciences*, (1997), 3^{ème} Colloque Général de la Société Française de Physiologie Végétale, 1-3 Décembre 1997, Toulouse, 314-315.
127. Lopez, F., Vansuyt, G., Derancourt, J., Fourcroy, P. et Casse-Delbart, F., Accumulation of a 22-kDa protein in the leaves of *Raphanus sativus* in response to salt stress or water deficit. *Physiol. Plant.*, V,91, (1994a), 605-614
128. Lopez, F., Vansuyt, G., Derancourt, J., Fourcroy, P. et Casse-Delbart, F., Identification by 2D-PAGE analysis of salt-stress induced proteins in radish (*Raphanus sativus*). *Cell Mol. Biol.*, V40,n°1, (1994b), 85-90.
129. Nishio, N., et Satoh, H., "A water-soluble chlorophyll protein in cauliflower may be identical to BnD22, a drought-induced, 22-kilodalton protein in rapeseed". *Plant Physiol*, V.115, (1997), 841-846.

130. Jofuku, K.D., et Goldberg, R.B., “Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants”, *Plant Cell*, V.1, (1989), 1079-1093.
131. Shinozaki, K. et Yamaguchi-Shinozaki, K., “Gene expression and signal transduction in water-stress response”, *Plant Physiol.*, V.115, (1997), 327-334.
132. Skriver, K., et Mundy, J., “Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress”, *Plant Cell*, V.2, (1990), 503-512.
133. Yamaguchi-Shinozaki, K., et Shinozaki, K., “A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress”, *Plant Cell*, V.6, (1994), 251-264.
134. Cheng, W.H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., “A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions”, *Plant Cell*, V.14, (2002), 2723–2743
135. Sharp, R.E., “Interaction with ethylene :changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress”, *Plant cell Environ*, V.25, (2002), 211–222
136. Shinozaki, K. et Yamaguchi-Shinozaki, K., “Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways.” *Curr Opin Plant Biol*, V.3, (2000), 217–223.
137. Zeevaart, J.A.D. et Creelman, R.A., “Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol*”, *Plant Mol. Biol.*, V.39, (1988), 439-473.
138. Hetherington, A.M. et Quatrano, R.S., “Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level”. *New Phytol.*, V.119, (1991), 9-32.
139. Hartung, W. et Davies, W.J., “Drought-induced changes in physiology and

- ABA". In Davies W.J., Jones H.G. eds, *Abscisic acid physiology and biochemistry*. BIOS, Scientific publishers, Oxford, (1991), 63-77
140. Wilkinson, S. et Davies, W.J., "ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants" *Plant Cell Environ*, V.25, (2002), 195-210.
141. Iwasaki, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. "Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis". *Mol. Gen. Genet.*, V.247, (1995), 391-398.
142. Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. et Shinozaki, K., "Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression". *Plant Cell*, V.9, (1997), 1859-1868.
143. Pla, M., Vilardell, J., Guiltinan, M.J., Marcotte, W.R., Niogret, M.F., Quatrano, R.S, et Pages, M., "The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water stress responses of the maize gene *rab28*". *Plant Mol. Biol.*, V.21, (1993), 259-266.
144. Coïc, Y. et Lesaint, C., "Comment assurer une bonne nutrition en eau et en ions minéraux en horticulture". *Hortic. Fr*, V.8, (1971), 11-14.
145. Maxwell, K. et Johnson, GN., "Chlorophyll fluorescence-a practical guide" *J. Exp. Bot* V..51, (2000), 659-668.
146. Havaux, M., Bonfils, J-P., Lütz, C. et Niyogi, K.K., " Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1* *Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase". *Plant Physiol*. V.124, (2000), 273-284.

147. Kitajima, M. et Butler, W.L., "Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in protoplasts by dibromothymoquinone", *Biochim. Biophys. Acta*, V.376, (1975), 105-115
148. Genty, B., Briantais, J.M. et Baker, N.R., "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence", *Biochimica et Biophysica Acta*, V.990, (1989), 87-92.
149. Lichtenthaler, H.K. et Wellburn, A.R., "Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents", *Biochem. Soc. Trans.*, V.603, (1983) 591-592.
150. Mills, W.R. et Joy, K.W., "A rapid method for isolation of purified physiologically active chloroplasts used to study the intracellular distribution of amino acids in pea leaves". *Planta*, V.148, (1980), 75-83.
151. Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4". *Nature*, V.227, (1970), 680-685.
152. Heukeshoven, J., Dernick, R., "Improved silver-staining procedure for fast staining". in Phast System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, V.9, (1988), 28-32.
153. Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J., "Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets", Procedure and application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, V.76, (1979), 4350-4354.

154. Hadj Youcef Taibi, H., Khaldoun, A. et Mekliche, A., “ Etude comparative de la tolérance à la sécheresse de 08 variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et de 04 variétés d’orge (*Hordeum vulgare* L.) analyse de la stabilité du rendement avec étude multilocale Céréaliculture, n° 38,(2003) , 26-31
155. Babani, F., Balota, M. Lichtenthaler, H.K., “Photosynthetic activity during autumnal breakdown of chlorophyll in tree species In Garrabon G (ed) Photosynthesis Mechanisms and Effects”. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, (1998) , 4019-4022.
156. Lu, C., Zhang, J., “ Changes in photosystem II function during senescence of wheat leaves ”. *Physiol Plant*, V.104, (1998), 239-247
157. Rosiak Figielek, B. et Jackowski, G., “The disappearance kinetics of Lhcb polypeptides during dark-induced senescence of leaves ”. *Aust J Plant Physiol*, V.27,(2000), 245-251.
158. Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B., Amasino, R.M., “A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment ”. *Plant Mol Biol* ,V.37, (1998), 455-469.
159. Stephenson, P.T., Rubinstein, B., “Characterization of proteolytic activity during senescence of daylily ”. *Physiol Plant*, V.104, (1998), 463–473
160. Huffaker, R.C., “ Proteolytic activity during senescence of plants ”. *New Phytol* ,V.116,(1990), 199–231
161. Belhassen, E., This, D. et Monneveux, P., “L’adaptation génétique face aux contraintes de la sécheresse ”. *Cahier Agricultures* V.4, (1995), 251-261.

162. Pruvot, G., "Identification et caractérisation de protéines chloroplastiques s'accumulant en réponse à un déficit hydrique progressif chez *Solanum tuberosum* L.". Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II, France, (1995), p155.
163. Chae, H.Z., Chung, S.J., Rhee, S.G., "Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast". *J. Biol. Chem.*, V. 269, (1994a), 27670-27678.
164. Chae, H.Z., Robinson, K., Poole, L.B., Church, G., Storz, G., Rhee, S.G., "Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes". *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, V. 91, (1994b), 7017-7021.
165. Baier, M., Dietz, K-J., "Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*". *Plant Physiol.* V. 119, (1999), 1407-1414.
166. Baier, M., Noctor, G., Foyer, C., Dietz, K-J., "Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism". *Plant Physiol.* V. 124, (2000), 823-832.
167. Baier, M., Dietz, K-J., "The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein : its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants". *Plant J.* V.12, (1997), 179-190.
168. Dos Santos, C.V., Cuiné, S., Rouhier, N. et Rey, P., "The *Arabidopsis* thalianoplastidic MsrB proteins : sequence and activity characteristics,

comparison of the expression with plastidic MsrA and induction by photooxidative stress". *Plant physiology*, V138, (2005), 909-922.

169. Langenkämper, G., Manac'h, N., Broin, M., Cuine, S., Becuwe, N., Kuntz, M., Rey, P., "Accumulation of plastid lipid-associated proteins (fibrillin/CDSP34) upon oxidative stress, ageing and biotic stress in Solanaceae and in response to drought in other species". *J. Exp. Bot.* V. 52, (2001), 1545-1554.