

CR000449

CR0100449

10/10/97

01/11/1997

DESS de Productivité Végétale

Immunodétection et Immunoquantification de l'Ascorbate peroxydase chez des légumineuses (Vigna et Phaseolus) présentant des sensibilités différentes au déficit hydrique.

présenté par Ndeye Ndack DIOP

le 19 novembre 1997

Laboratoire d'accueil :

Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale

Tour 54-64 E3 Case 70192, place Jussieu 75251 Paris cedex 05, France

Responsable de stage : Roselyne **FERRARI-ILIOU** (Maître de conférences)

Directeur du DESS: **Gérard TRAPY** (Maître de conférences)

Composition du jury : François **BOUTEAU** (Attaché temporaire d'enseignement et de recherches)
Evelyne **DUVAL** (Maître de conférences)
Yasmine **ZUILY-FODIL** (**Maître** de conférences)

REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Yasmine Zuily-Fodil responsable du laboratoire qui m'a accueillie chaleureusement dans son laboratoire et le Dr Roselyne Ferrari-Iliou qui m'a suivie tout au long de ce stage. Elles ont su par leur précieux conseils guider mon travail et m'ont encouragée pendant toute sa durée. Elles m'ont permis de faire mes preuves et je les remercie encore de leur disponibilité.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale pour leur soutien et leur capacité à rendre le travail agréable : Mixa, Ilyse, Anh, Monique, Agnès, Denis, Marcel et tous les autres. Je remercie également Gabriel qui, au cours de son stage de DEUG, m'a aidé.

Je remercie également tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenue au cours de ce travail : ma famille, ban, Rama, Socé, Malick.

Enfin, toute ma reconnaissance va au Dr Harold Roy-Macauley, Directeur du CERA 4 S, qui m'a permis de compléter ma formation par ce stage diplômant à l'Université Paris 7 Denis Diderot

La cellule végétale et plus particulièrement le chloroplaste sont à l'origine de la formation d'espèces activées de l'oxygène susceptibles de provoquer l'oxydation des composés cellulaires et d'en induire la désorganisation. L'ascorbate peroxydase est une enzyme capable de détoxifier le H₂O₂ formé dans différents compartiments cellulaires. La forme cytosolique, impliquée dans cette détoxification semble être régulée par le déficit hydrique. Des travaux antérieurs ont montré que la quantité stationnaire des ARNm codant pour l'APX cytosolique chez *Vigna* ainsi que l'activité enzymatique sont modulés par le déficit hydrique. Ce travail a consisté en la mise au point de la quantification préliminaire de l'APX cytosolique par immunodétection. Cette quantification préliminaire a été réalisée chez 4 cultivars appartenant au genre *Phaseolus* (Haricot) et *Vigna* (Haricot niébé) présentant des sensibilités différentes à la sécheresse. Les résultats préliminaires obtenus permettent de dire que chez les 4 cultivars la quantité d'APX détectée tend à augmenter jusqu'à un déficit hydrique moyen. Cependant, on a pu observer une augmentation de la quantité d'APX cytosolique détectée jusqu'à un déficit hydrique sévère chez les cultivars résistants à la sécheresse (appartenant au genre *Vigna*) et jusqu'à un déficit hydrique moyen, chez les cultivars sensibles (appartenant au genre *Phaseolus*).

ABREVIATIONS

$^1\text{O}_2$	oxygène singulet
APX	ascorbate peroxydase
DHA	déhydroascorbate
DHAR	déhydroascorbate réductase
EAO	espèces activées de l'oxygène
GR	glutathion réductase
GSH	glutathion
HRP	peroxydase de radis de noir
kDa	kilodalton
MDHA	monodéhydroascorbate
MDHAR	monodéhydroascorbate réductase
mg/gPF	milligrammes par grammes de poids frais
$\text{O}_2^{\bullet-}$	anion superoxyde
OH^{\bullet}	radical hydroxyde
PC	« personnel computer »
PM	masse moléculaire
PMSF	phénylméthanesulphonyl fluoride
PS	photosystème
PVP	polyvinyl pyrindone
SAB	sérum albumine bovine
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en SDS
SOD	superoxyde dismutase
TBS	« Tris-buffered saline-Tween »
ψ_w	potentiel hydrique foliaire

b, Les effets de la contrainte hydrique au niveau cellulaire

Le déficit hydrique est à l'origine de nombreux changements dans l'homéostasie cellulaire. Parmi ces changements, ont été observés : une inhibition de la biosynthèse des lipides (Pham Thi *et al.*, 1990), de la biosynthèse des protéines (Zuily-Fodil *et al.*, 1990), une inhibition des enzymes chloroplastiques (Robinson, 1988), une augmentation de la perméabilité membranaire (Vasquez Tello *et al.*, 1990), une génération d'anion superoxyde dans les chloroplastes endommagés (Smirnoff, 1993). Bien que la sécheresse inhibe globalement la synthèse protéique (Bewley, 1981; Zuily Fodil *et al.*, 1990) elle stimule néanmoins l'activité d'un certain nombre d'enzymes hydrolytiques telles que des protéinases (Roy-Macauley *et al.*, 1992) et des acylhydrolases (El-Hafid *et al.*, 1989) ainsi que des enzymes impliquées dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène (Price *et al.*, 1989).

La cellule photosynthétique semble être particulièrement sujette à des réactions oxydatives puisque d'une part, elle est le site de forte concentration d'O₂ (Robinson, 1988), d'autre part, les membranes thylacoïdiennes sont constituées en grande partie, d'acides gras polyinsaturés. Ainsi, le déficit hydrique induit une diminution de la teneur en acides gras polyinsaturés dans les membranes des chloroplastes (Ferrari-Iliou *et al.*, 1984). Les lipides les plus touchés sont les espèces moléculaires contenant deux molécules d'acide linoléique (Monteiro de Paula *et al.*, 1990). Cette diminution pourrait avoir deux origines : l'une enzymatique et l'autre non enzymatique. Par ailleurs, les acides gras polyinsaturés sont les plus sensibles à la peroxydation lipidique. Cette première voie enzymatique a été explorée et une diminution de la biosynthèse des lipides a été démontrée (Monteiro de Paula *et al.*, 1993) de même qu'une augmentation des dégradations enzymatiques (El Hafid *et al.*, 1989). La deuxième voie non enzymatique a permis de montrer que les acides gras polyinsaturés d'extraits lipophiles totaux de feuilles de plantes soumises à la sécheresse sont plus sensibles à l'attaque par l'oxygène singulet (Ferrari-Iliou *et al.*, 1993). Par conséquent, nous nous sommes intéressés au stress oxydant induit par le déficit hydrique et à la détoxification des composés toxiques dérivés de l'oxygène.

2. L'induction du stress oxydant

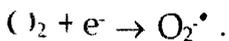
Chez les plantes comme chez les animaux, le stress oxydant correspond à la formation de dérivés toxiques de l'oxygène au cours du métabolisme. Chez les plantes et en particulier dans les organes photosynthétiques, il peut être défini entre autres comme une génération de dérivés toxiques de l' O_2 par des processus dépendant de la lumière, c'est-à-dire l'initiation et la propagation de la production d'oxydants résultant de l'illumination (Foyer et Harbinson, 1994). Ces dérivés toxiques sont constitués essentiellement par les espèces activées de l' O_2 (EAO) tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), l'oxygène singulet (1O_2) et des composés oxygénés comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces dérivés toxiques peuvent réagir avec tous les constituants oxydables de la cellule entraînant une série de dégradations oxydatives qui touchent les lipides, les protéines, les acides nucléiques et les sucres (Nair et *al.*, 1986; Halliwell et Gutteridge, 1989; Piette, 1991).

La formation des EAO et autres radicaux libres oxygénés peut se faire directement par la réduction de l' O_2 par la chaîne photosynthétique des transporteurs d'électrons ou indirectement par la réponse à une irradiation aux U.V. (Foyer et Harbinson, 1994). Un déficit hydrique moyen induit la réduction de l' O_2 afin, d'une part, de maintenir la quinone A dans son état oxydé, d'autre part, de permettre le transport des électrons (Smirnoff, 1993). En effet, lors d'un déficit hydrique, la fixation du CO_2 devient un facteur limitant en raison de la fermeture des stomates qui entraîne une inhibition de la photosynthèse. Dans les deux cas, l' O_2 est réduit aboutissant à la formation d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui est le précurseur de radicaux libres oxygénés beaucoup plus dangereux tels que l' OH^{\cdot} .

De plus, les pigments photosynthétiques permettent à la cellule d'absorber la lumière et d'utiliser l'énergie pour former des EAO (Asada et Takahashi, 1987). Ce métabolisme photosynthétique n'est pas seulement lié aux chloroplastes mais à la cellule entière où se produisent de nombreuses réactions faisant intervenir l' O_2 sous la forme de dérivés toxiques (Foyer et Harbinson, 1994). La réponse de la photosynthèse au déficit hydrique s'effectue en fonction de l'étendue du déficit, de l'intensité de son développement et de la radiation (Smirnoff, 1993). En effet, la radiation joue un rôle important lors de la limitation de la photosynthèse en raison des effets à court et long terme de l'excès d'énergie d'excitation en relation avec les mécanismes photoprotecteurs et ceux de la photoinhibition. Des travaux récents effectués au laboratoire sur *Phaseolus vulgaris* ont montré que le cycle des xanthophylles faisait partie d'une des réponses des végétaux supérieurs au déficit hydrique (d'Arcy-Lameta et *al.*, 1996).

3. Formation des EAO

Le déficit hydrique provoque une augmentation de la photoréduction de l'O₂ par la réaction de Mehler :



Cette réaction représente une des voies possibles de la formation des EAO (Smirnoff, 1993). La photoréduction a lieu au niveau du PS I avec production de O₂[•] qui forme par la suite l'H₂O₂ et le OH[•]. La formation d'O₂[•] peut avoir lieu également au niveau du PS II où l'O₂ agit comme un accepteur d'électrons et de ce fait pourrait protéger contre la photoinhibition (Ireland *et al.*, 1985). La génération d'O₂[•] au PS II pourrait être induite par l'autooxydation de la quinone B. Le PS II représente donc un site de photoréduction comme le PS I. Certains effets délétères semblent être dus à la photoinhibition et résultent de la formation d'EAO, comme par exemple la dégradation de la protéine D1 du PS II (Roberts *et al.*, 1991). Par conséquent, l'O₂ jouerait un double rôle au niveau du PS II. Celui-ci agit d'une part comme un photoprotecteur pour dissiper l'excès d'énergie d'excitation par le biais de la photoréduction, d'autre part comme facteur d'inactivation du PS II dans des conditions de déficit hydrique sévère (Krause *et al.*, 1985). De plus, l'¹O₂ est dans le chloroplaste, le résultat du transfert d'énergie de la chlorophylle du P680 à l'O₂ (Asada et Takahashi, 1987). Cette entité pourrait également provoquer une dépigmentation des antennes photosynthétiques (Elstner *et al.*, 1988).

4. Les systèmes de défense des plantes contre les EAO

Les plantes possèdent des systèmes de protection et de réparation qui limitent les effets du stress oxydant. Ces systèmes de défense sont de deux types. Les premiers impliquent l'intervention d'enzymes ou de molécules qui détoxifient les EAO telles que les superoxyde dismutases, les catalases, les peroxydases, l'ascorbate et l' α -tocophérol. Les seconds sont des systèmes qui maintiennent le pool des antioxydants à l'état réduit tels que le glutathion (GSH), la glutathion réductase (GR), l'ascorbate, la mono- et la déhydroascorbate réductase (MDHAR et DHAR).

En résumé, les SODs catalysent la dismutation de O₂[•] en H₂O₂ qui est à son tour pris en charge par les catalases localisées dans les peroxysomes et les glyoxysomes (Anderson et Beardall, 1991). Néanmoins, les catalases sont absentes des chloroplastes dans lesquelles la destruction de l'H₂O₂ est essentielle pour éviter l'inhibition des enzymes du cycle de Calvin (Kaiser, 1979; Tanaka *et al.*, 1982). C'est l'ascorbate peroxydase (APX) qui détoxifie principalement l'H₂O₂ dans les chloroplastes (Nakano et Asada, 1981). On la trouve néanmoins dans différents compartiments cellulaires : le cytosol (Chen et Asada, 1989), les nodules racinaires (Dalton *et al.*, 1987), les peroxysomes (Yamaguchi *et al.*, 1995) et les glyoxysomes (Bunkelmann et Trelease, 1996), les mitochondries (Jimenez *et al.*, 1997).

5. L'ascorbate peroxydase

5.1. Localisation

Quatre formes d'APX ont déjà été identifiées chez les végétaux : une forme cytosolique (cAPX) (Chen et Asada, 1989; Mitler et Zilinskas, 1991; Tanaka et al., 1991), une forme stromatique (sAPX) (Chen et Asada, 1989 ; Tanaka *et al.*, 1991; Mitler et Zilinskas, 1992), une forme thylacoïdale (tAPX) (Miyake *et al.*, 1993), une forme glyoxysomale (Yamaguchi *et al.*, 1995 ; Bunkelmann et Trelease, 1996) et enfin une forme peroxysomale (Yamaguchi *et al.*, 1995). Les formes glyoxysomale et peroxysomale semblent être identiques car elles sont présentes sur les "microbodies" avant leur différenciation en glyoxysome et peroxysome (Yamaguchi *et al.*, 1995). D'après ces auteurs, la pAPX (APX peroxysomale) est localisée sur la membrane externe des peroxysomes en contact avec le cytosol. Néanmoins, plus récemment Mullen et Trelease (1996) ont postulé que cette enzyme est interne à la membrane et que le peroxysome contient une partie des enzymes du cycle ascorbate/glutathion. L'APX détoxifie l' H_2O_2 qui échappe à l'action des catalases dans ces différents compartiments cellulaires. En effet, à cause de leur K_m élevé pour l' H_2O_2 , les catalases le dismutent à forte concentration. Les faibles concentrations d' H_2O_2 qui échappent à cette dégradation diffusent dans le cytosol où la pAPX dont le K_m vis à vis de l' H_2O_2 est faible, le dismute (Yamaguchi *et al.*, 1995). Des différentes ascorbate peroxydases, la cAPX reste la plus importante car elle possède une plus grande affinité pour l' H_2O_2 que la sAPX (Chen et Asada, 1989).

5.2. Caractéristiques de l'APX

Des travaux sur l'inhibition de l'activité de l'APX par le cyanure et l'azide (Nakano et Asada, 1987; Chen et Asada, 1989) suggèrent que l'APX possède un groupement prosthétique de nature métallique. Elle possède des groupements SH impliqués soit au niveau du site actif, soit dans le maintien de la conformation de l'enzyme. Ceci a été démontré aussi bien chez la sAPX de feuilles d'Épinard (Nakano and Asada, 1987), que pour l'APX d'Euglène (Shigeoka *et al.*, 1980), ou bien pour celle de nodules de racines de légumineuse (Dalton *et al.*, 1987) et pour la pAPX de Potiron (Yamaguchi *et al.*, 1995).

Le pH optimal est différent selon la forme d'APX étudiée. Ainsi, il est de 6.0 pour la cAPX (Chen et Asada, 1989) alors qu'il est de 7.0 pour la sAPX (Nakano et Asada, 1981; Chen et Asada, 1989).

L'ascorbate est le principal donneur d'électron de l'APX. Cette dernière présente une forte spécificité pour l'ascorbate contrairement aux peroxydases comme la peroxydase de radis noir qui possède une grande spécificité pour le guaiacol. Dans les feuilles de Thé, la sAPX présente une plus grande spécificité pour l'ascorbate que la cAPX. Elle ne réagit pas ou faiblement avec le GSH et le NADH. Par contre, la cAPX présente une plus grande réactivité vis à vis du pyrogallol, du guaiacol, de la dianisidine et de la diaminobenzidine que la sAPX (Chen et Asada, 1989).

L'APX s'inactive en absence d'ascorbate. Cela se fait à une vitesse plus ou moins grande en fonction du temps. L'inactivation est beaucoup plus rapide pour la sAPX (avec un temps de demie-vie de 40s) que pour la cAPX (demie-vie = 45 min.). Cette inactivation rapide de la sAPX a été constatée aussi bien chez les feuilles de Thé et d'Épinard (Nakano et Asada, 1987; Chen et Asada, 1989). Par contre, certaines APX notamment celles d'Euglène et de nodules racinaires de légumineuses n'ont pas besoin ti'ascorbate pour conserver leur activité (Shigeoka et *al.*, 1980 ; Dalton et *al.*, 1987).

La masse moléculaire (PM) de l'APX varie en fonction des isozymes étudiées de même qu'en fonction de la plante : la cAPX qui est un homodimère (Patterson et Poulos, 1995), a un PM de 57 kDa dans les feuilles de Thé (Chen et Asada, 1989), 31 kDa dans les feuilles d'Épinard (Tanaka et *al.*, 1991) et 28 kDa chez le Potiron (Yamaguchi et *al.*, 1995).

La sAPX est un monomère (Chen et Asada, 1989) et son PM qui a été déterminé chez les feuilles de Thé et d'Épinard correspond respectivement à 34 kDa et 31 kDa (Chen et Asada, 1989; Tanaka et *al.*, 1991). Chez le Potiron, deux isozymes ont été isolées, l'une de 38 et l'autre de 34 kDa (Yamaguchi et *al.*, 1995).

La tAPX est un monomère de PM 40 kDa (Miyake et *al.*, 1993).

La pAPX est un homodimère (Bunkelmann et Trelease, 1996). Les formes isolées à partir de glyoxysomes de Potiron et de graines d'oléagineux ont un PM de 31 kDa (Yamaguchi et *al.*, 1995; Bunkelmann et Trelease, 1996).

Dans ce contexte, le but du travail présenté ici concerne la détection immunologique (l'une APX dans notre système expérimental. Celui-ci est destiné à caractériser le nombre d'isozymes d'APX immunologiquement détectables et à effectuer une immunoquantification préliminaire de l'APX en fonction de différents stades de déficit hydrique chez des cultivars de Haricots tropicaux et de Haricots Niébé (*Phaseolus vulgaris* et *Vigna unguiculata*). Pour ce faire, la technique d'immunotransfert sera utilisée. Cette technique combine la résolution des protéines par électrophorèse sur gel et la spécificité de la détection immunochimique.

1. Matériel véaétal

Quatre cultivars appartenant au genre *Phaseolus* (Haricot) et *Vigna* (Haricot niébé) constituent notre matériel d'étude. Le genre *Vigna* est originaire d'Afrique et le genre *Phaseolus* du Brésil. Malgré leurs genres différents, ces cultivars sont très proches du fait de leur appartenance à la tribu des Phaseolideae et à la famille des Papillonacées.

Ces plantes présentent l'avantage d'une étude agronomique et biochimique approfondie. Cette étude a permis de les classer selon leur résistance à la sécheresse. Le genre *Vigna* est le plus résistant avec dans l'ordre de résistance le cultivar EPACE puis 1183 et le genre *Phaseolus* le plus sensible avec le cultivar IPA qui est plus résistant que Carioca. La classification dans l'ordre de résistance est la suivante du plus au moins résistant : "EPACE → 1183 → IPA → Carioca".

Ces plantes constituent un modèle d'étude de la résistance à la sécheresse. Les travaux réalisés permettent d'élaborer des marqueurs physiologiques, biochimiques et immunologiques afin d'orienter les croisements. De plus, elles sont cultivées dans plusieurs pays d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie où elles représentent une des principales sources de protéines. Leur amélioration permettrait aux populations de ces différentes zones tropicales de mieux lutter contre les baisses de rendement dues à la sécheresse.

1.1. Culture du matériel véaétal

Les plantes sont cultivées dans des pots en plastique de volume 650 cm³, dans un mélange de tourbe et de vermiculite (v/v = 1/1). Elles sont élevées en serre à Fontainebleau à une température de 25°C jour et 20°C nuit, sous un éclairage de 300 µE/m²/s, une photopériode de 14h et un arrosage journalier. Elles reçoivent de la solution nutritive 2 fois par semaine (fer chélaté, 0.05%, engrais soluble, 9 g/l : azote 14%, acide phosphorique 10%, potassium 14%). A l'âge de 5 semaines, elles sont transférées dans les serres du laboratoire sur le campus de Jussieu, dans les mêmes conditions expérimentales. Après une acclimatation de 2 à 3 jours, les plantes sont prêtes à subir le protocole de suspension d'arrosage.

1.2. Mesure de l'état hydrique des plantes

L'état hydrique est évalué par la mesure du potentiel hydrique d'une feuille bien développée au deuxième ou troisième rang en partant des feuilles cotylédonaire. Sa mesure est effectuée sur des plantes au point S₀ ou témoin (T) pour lesquelles le potentiel hydrique est voisin de -0.2 à -0.35 MPa avant l'induction du déficit hydrique. Pendant le protocole de suspension d'arrosage, la mesure est effectuée tous les 2 à 3 jours afin d'obtenir des plantes aux points S₁ (-1.0 MPa), S₂ (-1.5 MPa) et S₃ (-1.8 à -2.0 MPa).

Cette mesure s'effectue dans une chambre de pression (Corvallis, PM.5 instruments, USA). La feuille, coupée à la base du pétiole à l'aide d'un rasoir est introduite dans la chambre à pression. Le pétiole sort à l'extérieur de la chambre qui est hermétiquement fermée. Un gaz inerte (azote) est introduit progressivement dans la chambre jusqu'à apparition de la première goutte de sève dans le xylème au niveau de la section du pétiole. La pression enregistrée à ce moment correspond au potentiel hydrique.

1.3. Prélèvement des échantillons de plantes

Les folioles sont coupées au niveau du pétiole et enveloppées dans du papier aluminium, dont la tare est mesurée, pour obtenir environ 1 g de feuilles. L'échantillon enveloppé est pesé rapidement puis plongé dans l'azote liquide avant d'être conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

2. Extraction des protéines

Les folioles sont broyées dans de l'azote liquide en présence de PVP insoluble (120 mg/g de feuilles) jusqu'à obtention d'une poudre fine. Le tampon d'extraction (voir annexes page 36) est ajouté au broyat (1.2 ml/g de feuilles). Le mélange est ensuite homogénéisé au polytron (4 x 10 sec, vitesse 20500 tour à vide/min) (Diap 600, Heidolph, Allemagne) avant d'être centrifugé pendant 20 minutes à 20.000xg, 4°C (J2-21M/E, Beckman, Grande Bretagne). Le surnageant est prélevé et conserve à 4°C pour les étapes suivantes.

3. Dosage des protéines

Un dosage préalable des protéines contenues dans l'extrait est indispensable pour déposer la même quantité de protéines dans les différents puits en vue d'une comparaison ultérieure entre les différents extraits. De plus, le dosage permet d'éviter la surcharge des puits pouvant amener à des distorsions dans le gel. Ce dosage s'effectue selon la méthode de Bradford (1976) avec la sérum albumine bovine comme protéine standard.

4. Electrophorèse

L'électrophorèse se fait en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) est la plus utilisée pour déterminer d'une part la complexité et d'autre part le poids moléculaire des constituants polypeptidiques d'un extrait. Pour la détermination précise de la masse moléculaire d'une protéine, il est important de dissocier sa taille de sa charge. Ainsi, le SDS se lie sur les protéines formant des complexes polypeptide-SDS qui ont essentiellement des densités de charges identiques et la migration se fait selon la taille des protéines (Shapiro et *al*, 1967; Weber et Osborn, 1969). La dissociation des polypeptides est réalisée à 100°C, en présence d'un excès de SDS et d'un réactif riche en groupements thiols (-SH) tel que le 2-β-mercaptoéthanol qui coupe les ponts disulfure.

Le gel est discontinu avec un gel de concentration (stacking gel, grandes mailles : voir la composition en annexes page 37) et d'un gel de résolution (running gel, petites mailles: voir la composition en annexes page 37). Ce type de gel présente l'avantage d'une grande capacité de chargement.

Le volume d'extrait correspondant à la quantité de protéines par puits est calculé et l'extrait est mélangé à du tampon Laemmli (v/v = 1/1) (voir annexes page 37). Les échantillons sont incubés à 95°C pendant 5 min pour dénaturer les protéines avant leur chargement dans les puits du gel. La cuve d'électrophorèse (Mini Protean II™, Bio-Rad, Italie) est remplie avec tampon d'électrophèse (500 ml) (voir annexes page 38) et reliée aux bornes d'un générateur (PS 304, Apexel, France). La migration dans le gel de concentration (stacking gel) s'effectue à un voltage de 80 V (environ 10 min), puis un voltage de 120 V pendant un temps variable (1 h à 1 h 45 min selon la concentration du running gel).

Un contrôle positif de l'immunodétection est utilisé. Ne disposant pas de l'antigène purifié, il a été remplacé par une protéine de la même famille (les peroxydases) : la peroxydase de radis noir (Horse radish peroxydase HRP, 44 kDa, 5 µg par puits).

5. Transfert des protéines sur membrane ou Western blotting

Cette technique permet de transférer des protéines contenues dans l'épaisseur du gel à la surface de la membrane. La matrice la plus utilisée est la nitrocellulose. Les protéines sont liées et fixées sur la membrane de nitrocellulose par adsorption sur le support par une liaison non covalente.

La membrane de nitrocellulose (pores de 0.45 μm) coupée à la même dimension que le gel et marquée de la même manière (encoche en bas à droite) est placée dans le tampon de transfert (voir annexes page 38) pendant 30 min. Le gel, les papiers filtre (Whatman 3MM) et les tampons ScotchBrite™ (Mini protean II™, Bio-rad, Italie) sont immergés dans le tampon de transfert pendant 5 min. Le gel et la membrane de nitrocellulose sont ensuite mis en sandwich dans une grille entre les tampons ScotchBrite™ et les feuilles de papier filtre. Le sandwich ainsi préparé est placé verticalement dans le bloc de transfert (Mini protean II, Bio-rad, Italie) lui-même placé dans la cuve d'électrophorèse (Mini protean II, Bio-Rad, Italie). La cuve est remplie de tampon de transfert (1L). Le transfert est électrique et se fait durant la nuit (17 heures environ) en chambre froide (4°C). Un voltage de 60 V est imposé ainsi qu'un ampérage maximum (300 mA) afin qu'il ne constitue pas un facteur limitant (PS 3003, Apelex, France).

6. Coloration des protéines

6.1. Coloration au Rouge Ponceau

La coloration des protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose permet de mettre en évidence l'efficacité du transfert, le positionnement des marqueurs et la quantité approximative des différents extraits après leur migration sur le gel. Ce type de coloration a pour avantage de ne pas interférer avec la détection immunologique car le colorant est aqueux et disparaît au cours des différentes étapes de l'immunodétection.

La membrane de nitrocellulose est colorée au de rouge Ponceau 1 % (voir annexes page 38) pendant 3 à 5 min puis rincée dans de l'eau distillée.

5.2. Coloration du gel au Bleu de Coomassie

Elle permet de vérifier à la suite du transfert la quantité de protéines résiduelles dans le gel afin d'apprécier l'efficacité du transfert.

La coloration se fait au bleu de Coomassie (0.025 % dans du méthanol ou de l'éthanol 36%) (voir annexes page 38) pendant 1 h. Le gel est décoloré (voir annexe page 38) pendant 30 min et 2 h sous agitation, à température ambiante.

7. Immunodétection

Elle permet de détecter une protéine spécifique sur la membrane après transfert des protéines totales d'un extrait. Elle peut s'appliquer aussi bien sur des protéines dénaturées et séparées par une électrophorèse en SDS-PAGE que sur des protéines natives. Elle est basée sur l'attachement d'anticorps spécifiques sur des protéines qui présentent des structures antigéniques appelées épitopes.

7.1. Blocage des sites non spécifiques

La membrane de nitrocellulose a une grande capacité de liaison des **protéines**. Afin d'éviter une fixation non spécifique de l'anticorps d'une part sur la matrice de nitrocellulose (bruit **de fond**) et d'autre part sur des antigène non spécifiques donnant des bandes supplémentaires, les sites de fixation non occupés sur la membrane de nitrocellulose doivent être bloqués. Cette opération peut être **réalisée** par un système de saturation utilisant un certain nombre de protéines (sérum albumine bovine, hémoglobine, gélatine, lait en poudre écrémé, **ovalbumine**) ou des solutions contenant des détergents (Tween-20). Dans ce travail, nous avons utilisé la **sérum** albumine bovine ou le lait en poudre écrémé.

7.2. Liaison avec le premier anticorps

Les anticorps dont nous disposons sont des anticorps polyclonaux (antisérums). Ces anticorps polyclonaux permettent l'obtention d'un signal intense car ils contiennent une forte concentration d'anticorps spécifiques. L'antisérum que nous avons utilisé nous est fourni gracieusement par le laboratoire de Biochimie et **Physiologie Moléculaire** des Plantes de l'ENSAM/INRA de Montpellier qui travaille sur le stress salin chez le Radis.

Les anticorps se fixent à différents **épitopes** résistants à la dénaturation. L'incubation du premier anticorps (dirigé contre l'antigène étudié) nécessite une dilution fonction du titre de l'antisérum. Celle-ci se fait dans le tampon de blocage pour créer un effet de compétition entre la protéine de blocage et l'anticorps afin d'éviter son **attachement** sur des **épitopes** n'appartenant pas à l'antigène étudié.

7.3. Liaison avec le second anticorps

Un deuxième anticorps peut être utilisé pour détecter le premier (figure 1a). Cette **méthode** d'immunodétection est indirecte. Elle implique la fixation du deuxième anticorps, lui-même marqué, au premier anticorps non marqué. Elle a pour avantage d'amplifier le signal du fait qu'une grande quantité d'anticorps se lie à chaque antigène.

7.4. Lavages

Les lavages de la membrane sont essentiels: ils permettent d'obtenir un rapport adéquat entre le signal et le bruit de fond. Pour cela, il est important d'éliminer les liaisons non spécifiques.

La SAB (1%) est utilisée pour le blocage des sites non spécifiques (voir annexes page 38). L'incubation s'effectue pendant une durée d'1 h à température ambiante sous agitation ou la nuit à 4°C. La réaction antigénique suit la phase de blocage. Les anticorps sont dilués dans le tampon de blocage pour une incubation d'une heure. La membrane est lavée dans du tampon de lavage (200 ml de TTBS) (voir annexes page 38) et 4 fois successivement pendant 10 à 15 min. L'incubation du second anticorps dilué dans du tampon de blocage se fait pendant 1h à température ambiante. La membrane est ensuite lavée 4 fois (10 à 15 min dans 200 ml de TTBS).

7.5. Nettoyage de la membrane en vue d'une autre immunodétection

La même membrane peut être utilisée après lavage au moins 3 fois pour la détection avec d'autres anticorps.

La membrane est lavée pendant une durée de 30 min dans du tampon de nettoyage à 50°C (sous agitation) (voir annexes page 39) puis dans du TTBS pendant 10 min (2 bains).

7.6. Révélation

La méthode ECL (Amersham) est utilisée. Elle consiste en une révélation par chimioluminescence. Cette dernière est une émission de lumière résultant de la dissipation d'énergie d'un substrat qui est à un stade excité. L'excitation est effectuée par une réaction chimique utilisant les diacylhydrazides cycliques telles que le luminol. Le système le plus étudié est celui utilisant la HRP et l' H_2O_2 qui catalyse l'oxydation du luminol en conditions alcalines. Suite à l'oxydation, le luminol se trouve dans un état excité et par une émission de lumière il retrouve son niveau basal (figures 1a et 1b). La lumière émise est maximale après 5 à 20 min puis s'atténue lentement avec un temps de demie vie de 60 min (Western blotting protocols, ECL, Amersham).

La révélation se fait par l'intermédiaire de deux 2 réactifs ECL mélangés ex temporanément (v/v = 1/1) et versés sur la membrane de nitrocellulose. Le mélange doit recouvrir toute la surface de la membrane et la réaction se produit pendant 1 min sans agitation. La membrane est mise en autoradiographie (X-Omat, Kodak, Allemagne). L'exposition est effectuée pendant une durée variable. La première exposition est de 15 sec à 1 min suivant l'intensité du signal. L'intensité du signal ainsi obtenu après révélation du film détermine le temps d'exposition nécessaire.

8. Quantification de la quantité de protéines par densitométrie

Les autoradiographies sont numérisées (Scanner StudioStar, Agfa, France; logiciel FotoLook 2.09 SA), traitées par le logiciel Corel Photo-Paint! (version 4) et l'analyse densitométrique est réalisée par un logiciel d'intégration d'image (Imager Soft 1D & 2D, Appligène, France). Pour chaque tache, la somme des gris est calculée et le bruit de fond est soustrait.

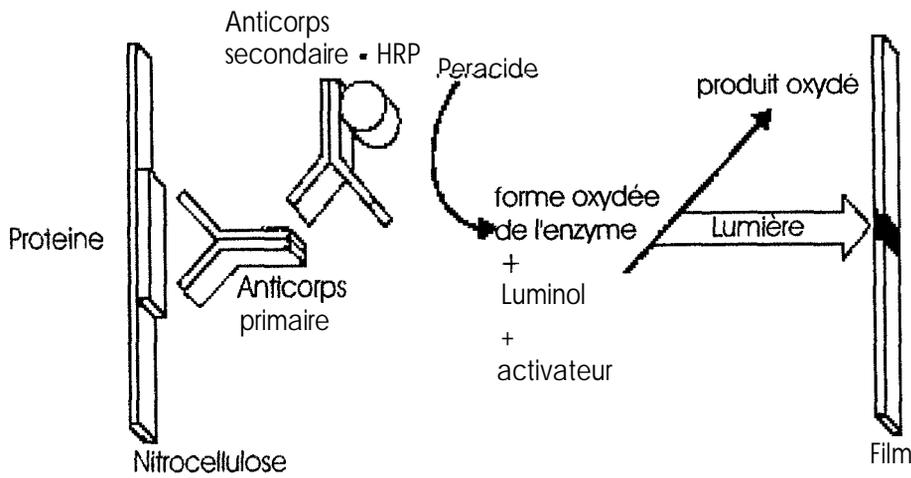


Figure 1a,

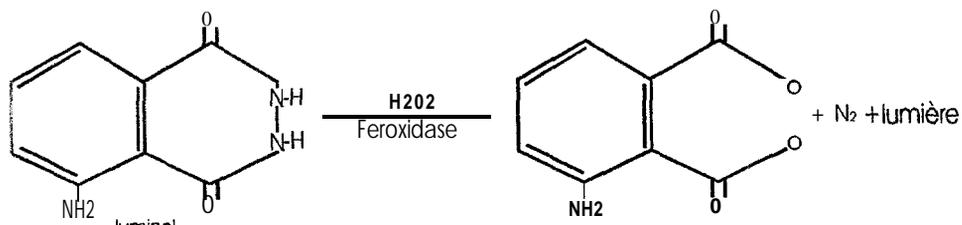


Figure 1 b

Figure 1 : Immunodétection par la méthode ECL. Figure 1a : Les différentes étapes de l'immunodétection, Figure 1b : La réaction catalysée par la HRP (Horse raddish peroxidase) et l' H_2O_2 . D'après Western blotting protocols (ECL, Amersham).

1. Mise au point de la méthode

1.1 Electrophorèse

La mise au point des conditions expérimentales est nécessaire afin de déterminer la concentration d'acrylamide pour laquelle l'APX, petite protéine de 30 kDa environ est le mieux séparée. Différents pourcentages d'acrylamide ont donc été testés.

Les premiers travaux ont été effectués à une faible concentration d'acrylamide (8%) pour obtenir un point de repère. D'après la migration des marqueurs moléculaires colorés au rouge Ponceau, la bande correspondant au PM = 94 kDa est trop proche de celle qui correspond au PM = 30 kDa (figure 2). De plus, l'immunodétection montre pour les extraits d'IPA deux bandes d'où éventuellement la présence de deux isozymes chez ce cultivar (figure 3a).

Afin de permettre une séparation plus adéquate des protéines, une concentration de 13% en acrylamide a été testée (Chen et Asada, 1989; Tanaka et al, 1991; Sgherri et al, 1994; Yamaguchi et al, 1995).

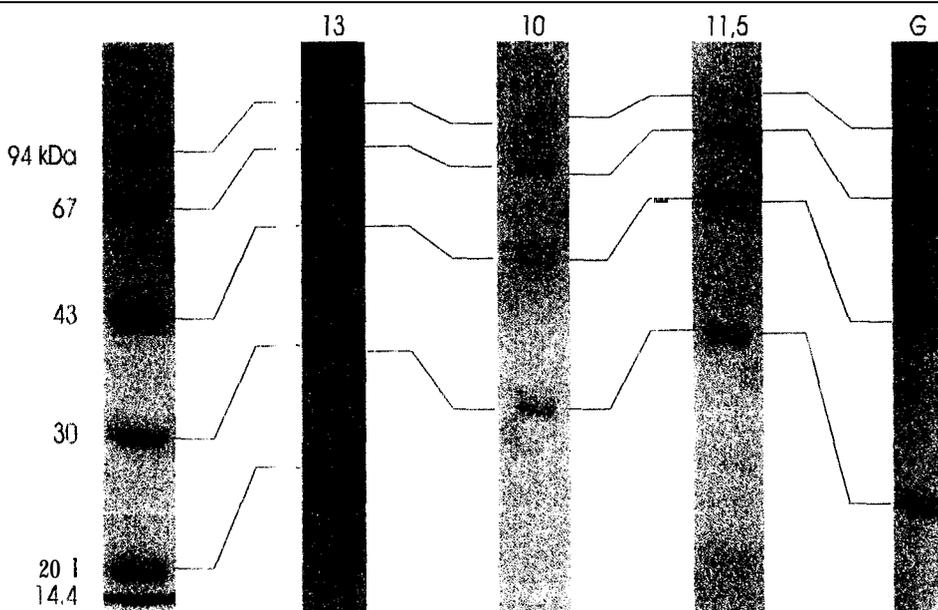


Figure 2 : Résultat de la séparation par SDS-PAGE des marqueurs de PM sur la membrane de nitrocellulose colorée au rouge Ponceau. De gauche à droite figurent les différentes concentrations d'acrylamide utilisées : 8%, 13%, 10%, 11.5% et un gradient (G) de 8 à 13% d'acrylamide. 9.65 µg de protéines ont été déposées dans chaque puits.

Les résultats montrent (figure 2) une meilleure résolution des protéines. Cependant l'immunodétection ne révèle qu'une seule bande dans la zone de 30 kDa et donc semble ne pas permettre de mettre en évidence d'éventuelles isozymes (figure 3).

De plus, ce gel présente un inconvénient au niveau du transfert (figure 4a). En effet, la taille des mailles ne semble pas favoriser un transfert complet dans les conditions que nous utilisons. Par conséquent, une diminution de la concentration d'acrylamide devrait permettre d'obtenir une bonne séparation des protéines dans la zone où se trouve l'APX.

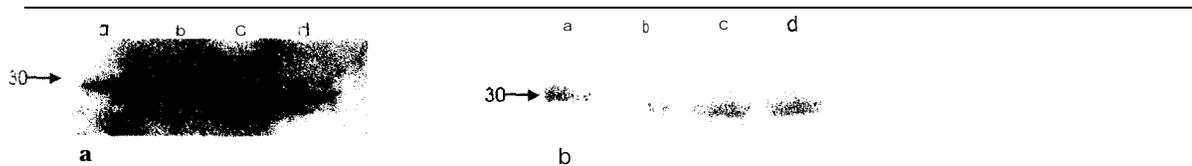
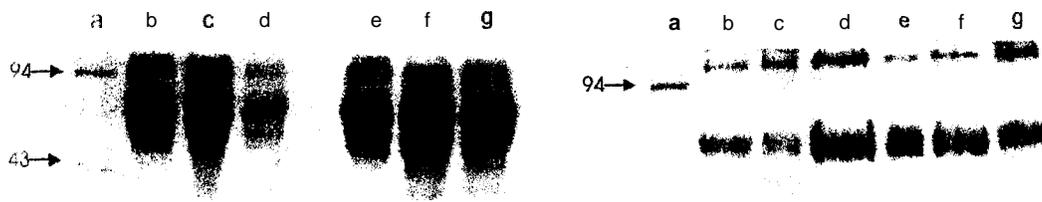


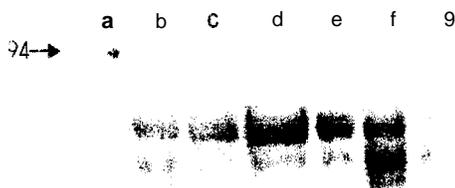
Figure 3: Mise au point de l'immunodétection. Figure 3a : Le gel utilisé contient 8% d'acrylamide. Les deux premiers puits (a et b) contiennent des extraits d'EPACE [a : plante bien hydratée et b : déficit hydrique moyen (S2)]. Les deux derniers puits contiennent des extraits d'IPA [c : plante bien hydratée et d : déficit hydrique moyen (S2)]. **Figure 3b :** Le gel à 13% d'acrylamide. Le puits a correspond aux marqueurs de PM et les puits b, c, d contiennent des extraits d'IPA [a : plante bien hydratée; b : déficit hydrique moyen (S2); c : déficit hydrique sévère (S3)].

Les résultats de l'électrophorèse pour des gels à 11.5% et 10% d'acrylamide (figure 2) montrent une résolution des bandes correctes, cependant, le transfert demeure incomplet (figures 4b et 4c).

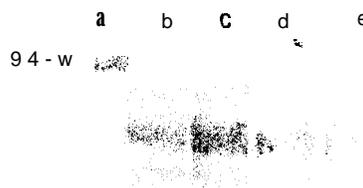
Etant donné que l'augmentation du pourcentage d'acrylamide de 8% à 33% entraîne un mauvais transfert des protéines, nous avons tenté de réaliser un gel en gradient linéaire d'acrylamide allant de 8 à 13%. Ceci permet d'obtenir un maillage large pour les protéines de haut PM et qui diminue avec la taille des protéines afin d'améliorer l'efficacité du transfert.



a: Gel à 13%



b: Gel à 11.5%



c: Gel à 10%

d: Gradient 8-13%

Figure 4: Comparaison des résultats obtenus pour différentes concentrations d'acrylamide. Les gels sont colorés au bleu de Coomassie après transfert. Les figures a, b et c correspondent aux mêmes extraits. De gauche à droite, la piste a correspond aux marqueurs de PM, les pistes b, c, d et e, f, g correspondent respectivement aux extraits de EPACE témoin avec 40 μ g, 80 μ g et 120 μ g de protéines solubles et IPA témoin avec 40, 80 et 120 μ g de protéines solubles. La figure d correspond à l'extraction d'IPA témoin et les pistes correspondent, gauche à droite, la piste a les marqueurs de PM, les pistes b, c, d et e à des concentrations de protéines solubles qui sont respectivement 40, 60, 80 et 100 μ g.

Les résultats obtenus (figures 2 et 4d) montrent qu'un gradient linéaire d'acrylamide (8-13%) permet d'obtenir une bonne séparation des protéines ainsi qu'un meilleur transfert. Par conséquent, le gel en gradient d'acrylamide de 8 à 13% est retenu pour la suite des expériences.

1.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Un transfert de protéines s'effectue généralement sous un voltage de 100 V et un ampérage de 250 mA pendant une durée de 1h à 2h. Ces conditions se révèlent insuffisantes dans notre cas. Une étude systématique a été effectuée en faisant varier les différents paramètres de l'électrotransfert. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

[acrylamide] (%)	voltage (V)	ampérage (mA)	durée du transfert (h)	résultats du transfert
8	7-9	40	17	complet
13	7-9	40	17	incomplet
13	20	70	17	incomplet bien que meilleur
13	40	300	17	incomplet
13	80	300	17	incomplet et le tampon est oxydé
13	60	300	24	incomplet
gradient 8-13	60	300	17	satisfaisant

À la suite de ces résultats, les dernières conditions expérimentales ont été retenues.

1.3. Tampon d'extraction des protéines

La mise au point du tampon d'extraction des protéines en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'APX est nécessaire afin que celle-ci soit mieux représentée dans notre extrait final.

Tampon phosphate (50 mM, pH 7.8)

Le tampon phosphate est celui qui est préconisé pour l'extraction et pour les mesures d'activité de l'APX (Chen et Asada, 1989; Mittler et al., 1991; Elia et al., 1992; Koshiba et al., 1993; Miyake et al., 1993). Il contient de l'EDTA (chélateur d'ions métalliques, inhibiteur de métalloprotéases), du PMSF (inhibiteur irréversible des sérineprotéases), de la leupeptine (inhibiteur réversible des sérineprotéases), du PVP insoluble (pour piéger des polyphénols) et de l'ascorbate.

Après extraction avec ce tampon, l'immunodétection montre que la liaison entre l'APX et l'anticorps s'est effectuée au niveau de 4 bandes situées entre 44 et 28.8 kDa (figure 5a). Mais ces bandes sont très fines et afin de confirmer qu'il s'agit de bandes correspondant à des peroxydases, la quantité de protéines par puits est multipliée par 3, passant de 38.5 µg (figure 5a) à 120 µg (figure 5b). Dans ces nouvelles conditions, 2 bandes apparaissent (figure 5b), l'une à 44 kDa et l'autre à 28.8 kDa.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la bande 28.8 kDa qui correspond à la taille de l'ADNc que nous avons cloné et séquencé et qui code pour une APX cytosolique chez *Vigna*. En ce qui concerne l'autre bande détectée (44 kDa) des analyses complémentaires sont nécessaires pour savoir s'il s'agit réellement d'une APX.

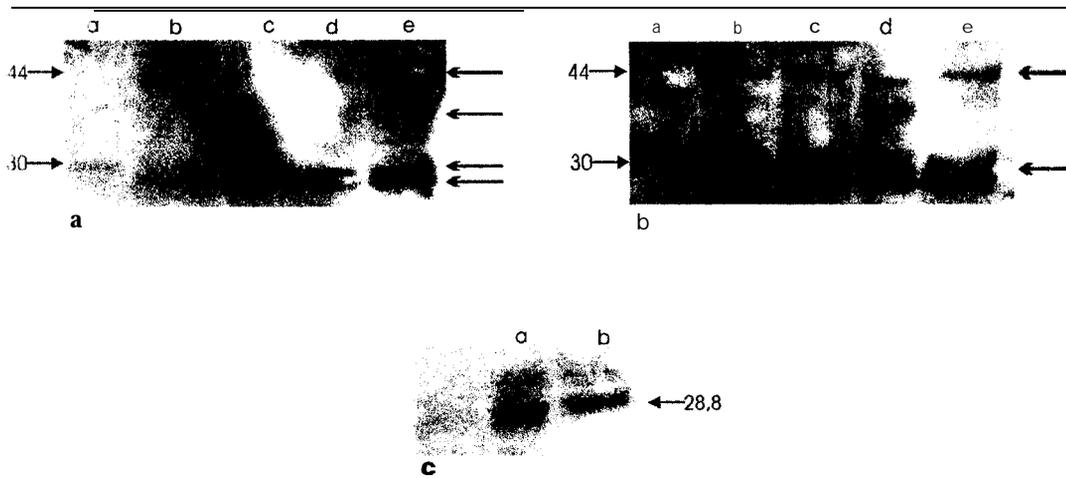
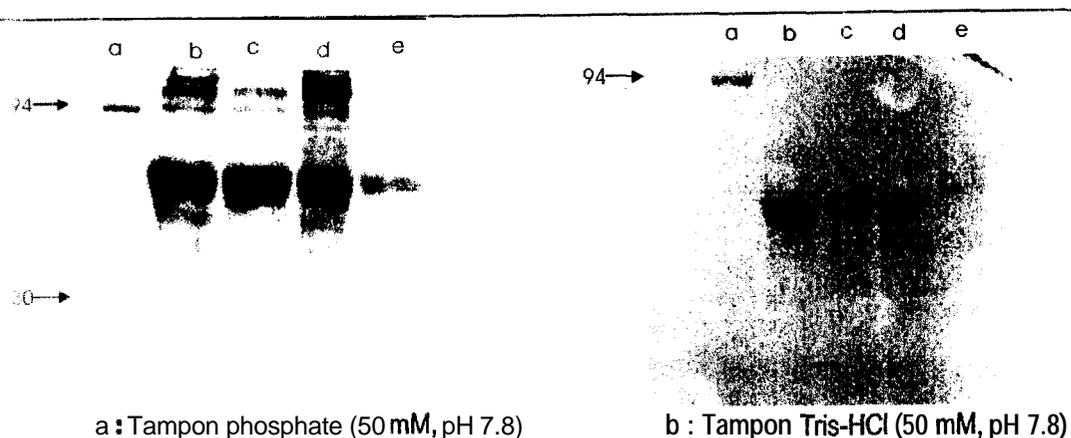


Figure 5: Résultats de l'immunodétection après une extraction de protéines dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7.8. Essais de chargement des puits avec différentes quantités de protéines. Figures 5a et 5b: 38.5 et 120 μg de protéines respectivement, le puits a correspond aux marqueurs de PM et les puits b, c, d, e contiennent respectivement EPACE T, EPACE S_2 , IPA T et IPA S_2 . Figure 5c : Extraction des protéines de feuille de IPA (S_2) dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7.8 (a et b: 40 et 60 μg de protéines respectivement).

Les conditions de transfert n'étant pas optimales dans ces conditions (figure 6a), nous avons utilisé un tampon adapté à l'électrophorèse des protéines.

Tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7.5)

Le Tris est la base du tampon d'électrophorèse (Leammi, 1970), son utilisation pour l'extraction des protéines pourrait résoudre les problèmes rencontrés au cours du transfert. En effet, le transfert s'est avéré meilleur bien que restant incomplet (figure 6b).



a : Tampon phosphate (50 mM, pH 7.8)

b : Tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7.8)

Figure 6: Le gel d'acrylamide a été coloré au bleu de Coomassie après le transfert sur membrane de nitrocellulose pour comparer l'efficacité du transfert après électrophorèse des protéines extraites dans un tampon phosphate 50 mM pH 7.8 (figure 6a) et dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.8 (figure 6b). Figure 6a : puits a: marqueurs de PM; Puits b et c: EAPCE témoin et S₂; puits d et e: IPA témoin et S₂ et une concentration de protéines par puits de 100 µg. Figure 6b : puits a: marqueurs de PM, les puits b, c, d et e: IPA T aux concentrations par puits suivantes: 40, 60, 80, 100 µg respectivement.

Tampon avec ou sans ascorbate

L'ascorbate est nécessaire à la protection des APX vis à vis de l'hydrolyse par des protéases présentes dans les extraits. La sAPX et la tAPX (d'origine chloroplastique) se dénaturent notamment dans un tampon d'extraction ne contenant pas d'ascorbate. Celui-ci est ajouté au tampon afin de détecter les deux types d'APX, la cAPX et la sAPX et d'observer éventuellement la présence d'une ou de plusieurs bandes correspondant à ces isozymes.

D'après les résultats obtenus, le dosage comparatif des protéines extraites avec ou sans ascorbate ne révèle pas d'augmentation notable de la quantité de protéines extraites en présence d'ascorbate (tableau 1). De plus, la présence ou l'absence d'ascorbate ne change pas le profil électrophorétique (figure 7). Néanmoins, pour des raisons de sécurité, l'extraction s'est faite en présence d'ascorbate afin d'assurer la protection de l'APX vis à vis des protéinases présentes dans le milieu d'extraction,

Plantes	Qté de protéines (mg/g de poids frais)	
	tampon - ascorbate	tampon + ascorbate
EPACE T	5,28	6,55
EPACE S ₂	7,81	7,97
Carioca T	10,58	12,15
Carioca S ₂	15,37	14,21

Tableau 1 : Comparaison de la quantité de protéines solubles extraites dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7.8 en présence ou en absence d'ascorbate de sodium (4 mM) chez EPACE et Carioca témoin (T : $\psi_w = -0.3$ MPa) ou soumis à un déficit hydrique moyen (S₂ : $\psi_w = -1.5$ MPa).

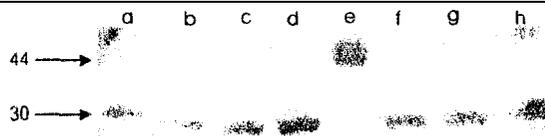


Figure 7 : Comparaison de l'extraction des protéines solubles en présence ou en absence d'ascorbate. Les puits b,c,d: extraits en absence d'ascorbate, les puits f,g,h: extraits en présence d'ascorbate. Puits a: marqueur de poids moléculaire, puits e: HRP (Horse rshddish peroxydase). Les puits b, c, d, f, g et h contiennent respectivement des extraits de Carioca T, S₂ et IPA S₃ et une quantité de protéines par puits de 55 µg.

1.4. Quantité de protéines par puits

Une concentration de protéines de 38.5 µg laisse apparaître des bandes fines (figure 5a). En augmentant la concentration jusqu'à 120 µg (figure 5b) la bande détectée est très importante et ne permet pas de distinguer 2 bandes rapprochées. En effet, il semble que 2 bandes de PM proches soient superposées. L'étude comparative de 2 concentrations différentes, 40 et 60 µg (figure 5c) montre, dans les 2 cas, une bande unique, facilement détectable. Cela nous a amené à choisir une quantité de protéine de 50 µg par puits qui sera la même utilisée pour les 4 cultivars.

1.5. Immunodétection

Dilution du 1er anticorps

L'antisérum fourni est un antisérum de lapin. Il a été utilisé à la dilution de 1/1000 pour tester son affinité avec l'APX de nos extraits de *Vigna unguiculata* et de *Phaseolus vulgaris*. La rapidité du signal obtenu (10 sec en autoradiographie) et le bruit de fond très important nous ont amené à diminuer la concentration d'anticorps utilisée (ECL, Western blotting protocoles, Amersham). Les deuxième et troisième dilutions testées furent 1/5000 et 1/10000. Néanmoins, aucune différence n'est obtenue pour ces 2 dilutions. Afin de minimiser le bruit de fond dû à un excès d'anticorps, la dilution au 1/10000 est retenue.

Dilution du 2ème anticorps

La dilution du second anticorps, anticorps de chèvre dirigé contre l'Ig de lapin est de 1/5000 et semble correspondre à la bonne dilution de départ. Néanmoins et en raison du bruit de fond important, cette dilution a été amenée à 1/10000, puis à 1/100000 (Lillehoj, 1994).

Tampon de blocage

La diminution de la concentration du premier et du second anticorps n'a pas permis d'obtenir un bruit de fond tolérable (bon rapport signal/bruit de fond). Le changement du tampon de blocage a été effectué pour résoudre ce problème. Un premier essai a été effectué avec de la caséine à 0.2% dans du TTBS. Les résultats obtenus étant peu concluants, et pour améliorer le rapport signal/bruit de fond, la SAB Fi 1% (dans TTBS) a été testée. L'utilisation de cette protéine amène une nette diminution du bruit de fond. D'autres tampon de blocage ont été testés pour éliminer le bruit de fond :

- **1% de lait en poudre écrémé et 3% de SAB**
- **1% de lait en poudre écrémé**
- **3% de SAB**
- **2% de SAB**

Dans tous les cas, le **signal disparaît même si parallèlement la concentration du premier anticorps est amenée jusqu'à 1/5000. Par conséquent, 1% de SAB dans le tampon de blocage a été utilisée comme agent bloquant pour la suite des expériences.**

1.6. Protocole adopté

Expérimentation	Conditions ou composition des tampons
Extraction des protéines	tampon Tris-HCl (50 mM), pH 7.8, avec ascorbate
Electrophorèse	50 µg de protéines par puits
Transfert	17 h à 60 V et 300 mA
Tampon de blocage	1% de SAB
1er anticorps	dilution à 1/10000
2ème anticorps	dilution à 1/100000

2. Quantification préliminaire de l'APX

2.1. Evolution de la teneur en protéines des extraits au cours du déficit hydrique et de la réhydratation

Après un broyage des feuilles des différents **cultivars** dans les mêmes conditions, les extraits présentent un comportement différent (figure 8). En ce qui **concerne** EPACE, l'extrait obtenu à partir de feuilles de plante bien hydratée est celui qui contient le moins de protéines avec 9.8 mg/g de poids frais (mg/gPF). Chez IPA, 1183 et Carioca, la quantité de protéines est respectivement égale à 11.3, 13 et 19.5 mg/gPF.

Le genre Vigna

En ce qui concerne les témoins, les extraits du cultivar 1183 présentent une teneur **en protéines en mg/gPF** supérieure à celle dosée dans les extraits du cultivar EPACE. La quantité de protéines varie très faiblement en fonction de l'intensité du déficit hydrique (figure 8a) chez EPACE alors qu'elle diminue chez le 1183 (figure 8b).

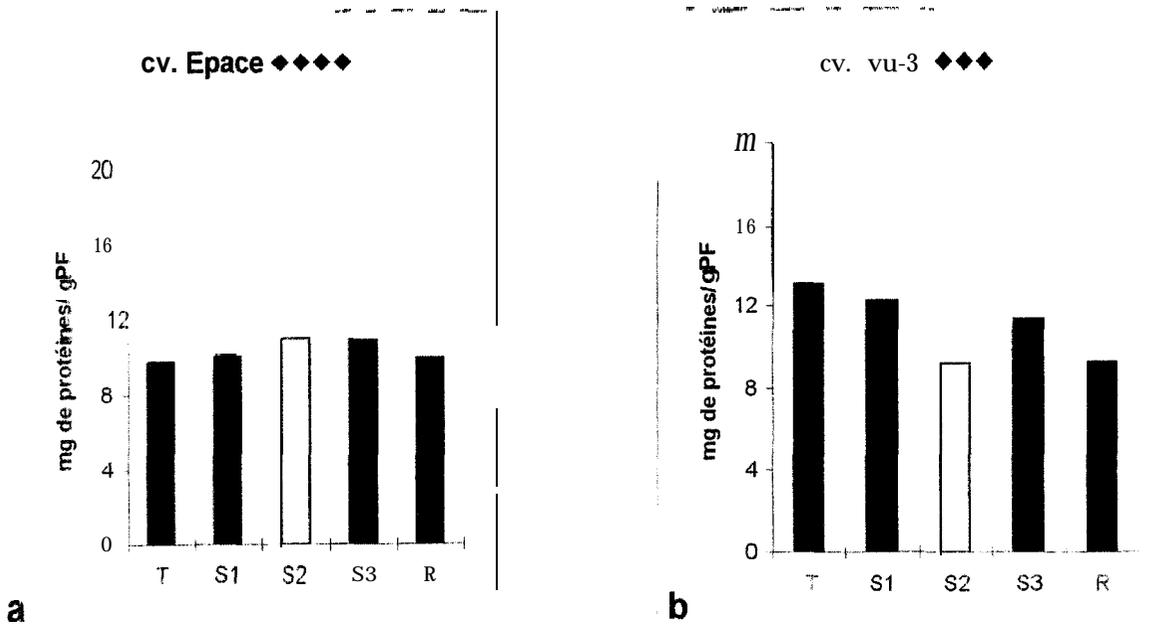
Le genre Phaseolus

Les extraits du cultivar Carioca sont plus riches en protéines que ceux du cultivar IPA. Chez le cultivar IPA la teneur en protéines des extraits exprimées en mg/gPF semble augmenter en fonction du déficit hydrique alors qu'elle diminue pour Carioca (figures 8c et 8d).

La réhydratation effectuée pendant 24h des plantes au stade S₂ aboutit à l'obtention d'extraits dont le contenu protéique exprimé en mg/gPF est voisin de celui des témoin (figure 8).

Evolution des protéines solubles dans les extraits

Vigna unguiculata



Phaseolus vulgaris

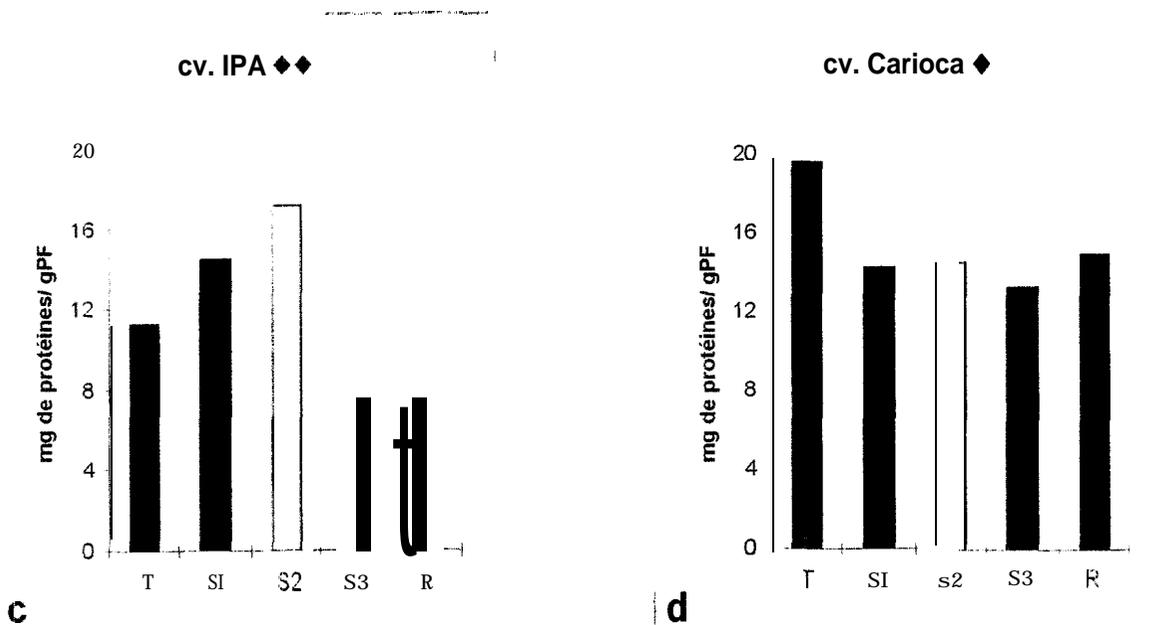


Figure 8: Evolution des protéines solubles (en mg/g PF) au cours du déficit hydrique appliqué chez les 4 cultivars. EPACE, 1183, IPA et Carioca. T=plante bien hydratée ($\psi_w = -0.3$ MPa), S₁=déficit hydrique léger ($\psi_w = -1.0$ MPa), S₂=déficit hydrique moyen ($\psi_w = -1.5$ MPa), S₃=déficit hydrique sévère ($\psi_w = -1.8$ MPa). Ces cultivars ont également été soumis à la réhydratation après le point S₂ (R=réhydratation).

↳ tolérance à la sécheresse en champ et au déficit hydrique

2.2. Estimation de la valeur du PM de l'APX

Le calcul de la distance de migration des bandes immunodétectées par rapport au front de migration permet d'estimer la taille de l'APX. La représentation graphique $\log PM = f(Rf)$ (figure 9) a permis de déterminer un PM environ égal à 28.8 kDa. Cette valeur est estimée à partir de la droite de régression de la figure 9.

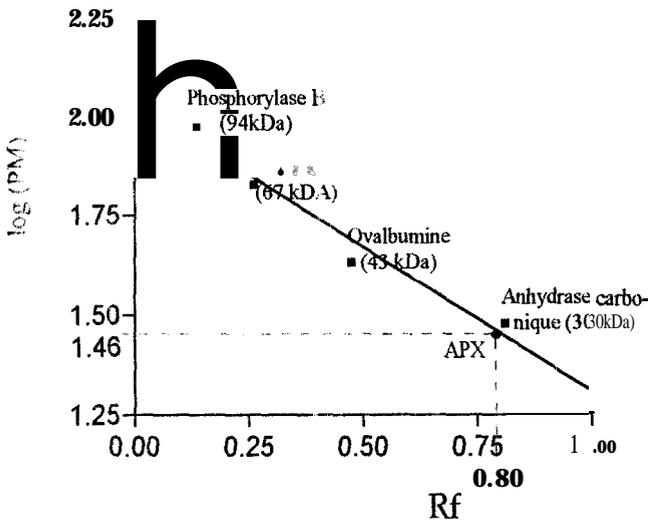


Figure 9: Détermination du poids moléculaire approché de l'APX sur la membrane colorée au rouge Ponceau. Le log du PM de chacun des marqueurs a été calculé et porté en fonction de la distance de migration de chaque protéine par rapport au front électrophorétique. La superposition de l'autoradiographie à la membrane colorée au rouge Ponceau permet de déduire la distance de la migration de l'APX putative par rapport aux différents marqueurs et d'en déduire son PM.

2.3. Effet de la contrainte hydrique sur la quantité d'APX (étude préliminaire)

Afin de suivre l'évolution de l'APX sous l'effet du déficit hydrique pour chaque cultivar, les résultats de l'analyse densitométrique des autoradiographies sont exprimés en % par rapport au témoin (figure 10).

Le genre *Vigna*

Cns du cultivar EPACE

Un déficit hydrique léger (S_1) n'entraîne aucune variation par rapport au témoin (figure 10a) tandis qu'un déficit hydrique moyen (S_2) est à l'origine d'une augmentation de la quantité d'APX de 100 % par rapport au témoin. Cette augmentation est de 200 % entre S_1 et S_2 . La quantité d'APX augmente de 180 % pour un déficit hydrique sévère (S_3) par rapport au témoin bien hydraté.

Cas du cultivar 1183

La quantité d'APX diminue de 25% par rapport au témoin sous l'effet d'un déficit hydrique faible (S_1) (figure 10b) puis elle augmente de 40% pour un déficit hydrique moyen (S_2) et de 55% quand le déficit hydrique devient sévère (S_3) par rapport au témoin bien hydraté.

Le genre *Phaseolus*

Cas du cultivar IPA

La quantité d'APX diminue également de 27% pour un déficit hydrique faible (S_1) (figure 10c) par rapport au témoin. Cette diminution pour S_1 est suivie d'une augmentation pour une sécheresse moyenne (S_2). Néanmoins, elle ne permet **pas de retrouver** le niveau observé pour le témoin (-16%). Sous l'effet d'un déficit hydrique sévère (S_3), IPA retrouve une quantité d'APX identique à celle présente chez la plante soumise à un déficit hydrique faible (S_1).

Cas du cultivar Carioca

La quantité d'APX augmente en fonction de l'intensité du déficit hydrique (figure 10d). Quand celui-ci est léger (S_1) il entraîne une augmentation de 28% par rapport au témoin tandis qu'à une intensité **moyenne** (S_2), il augmente de 90%. Sous l'effet d'un déficit hydrique sévère (S_3), la quantité d'APX diminue de nouveau tout en restant 38% plus élevée que celle du témoin.

D'une manière générale, chez le genre *Vigna*, la quantité d'APX augmente lorsque le déficit hydrique devient sévère tandis que **chez** le genre *Phaseolus*, elle augmente chez le cultivar Carioca et elle tend à se maintenir au même niveau que le témoin.

2.4. Effet de la réhydratation sur la quantité d'APX (étude préliminaire)

La réhydratation concerne des plantes au stade S_2 réhydratées (arrosage) et prélevées après 24 H.

Cas du genre Vigna

On observe une augmentation de la quantité d'APX par rapport à S_2 de 8% et de 7% pour les cultivars EPACE et 1183 respectivement. Par rapport aux témoins on observe une augmentation de la quantité d'APX détectée de 116% (EPACE) et de 50% (1183).

Cas du genre Phaseolus

On observe également une augmentation de la quantité d'APX par rapport aux plantes au stade S_2 , soit 47% et 28% pour les cultivars IPA et Carioca respectivement. Par rapport aux témoins on observe une augmentation de la quantité d'APX détectée **de 24% (IPA) et de 143% (Carioca)**.

2.5. Conclusion

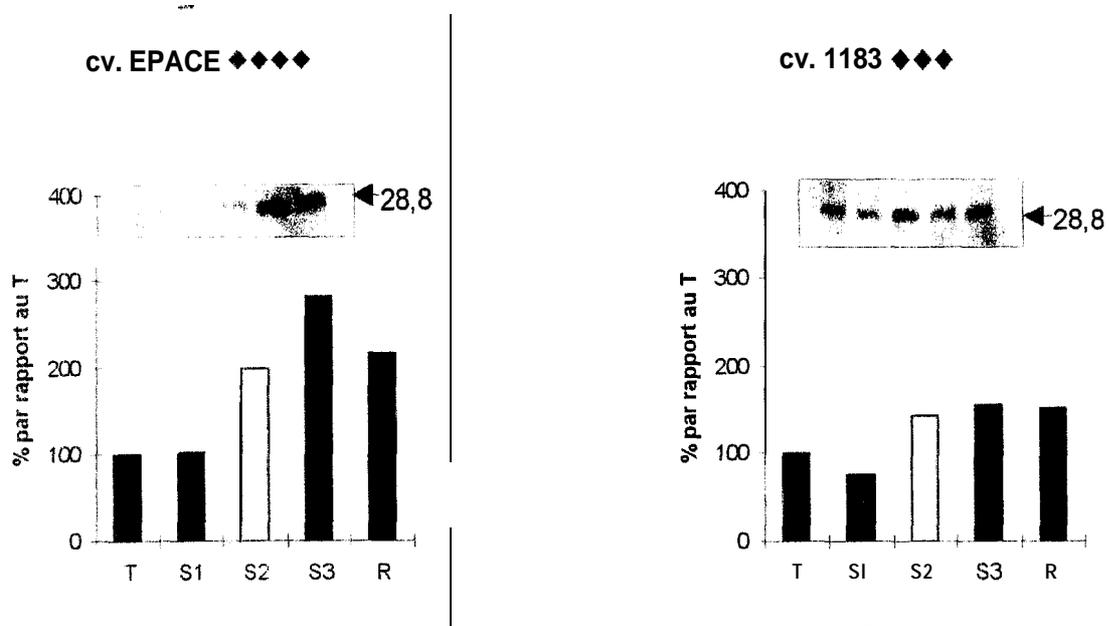
Globalement, le déficit hydrique induit une augmentation de la quantité d'APX détectée. Cette réponse est particulièrement évidente chez le cultivar le plus tolérant de *Vigna* (EPACE). L'autre cultivar de *Vigna* 1183, moins tolérant, présente la **même** réponse, mais elle est atténuée.

Le cultivar moyennement tolérant de *Phaseolus* (IPA) parvient à maintenir plus ou moins sa teneur en APX en cours de la contrainte. Le cultivar le plus sensible (Carioca) est également celui qui présente à l'état témoin la teneur la plus faible en APX. La plante tente de s'adapter en augmentant apparemment la teneur en APX (S₂) mais, elle ne peut maintenir cette réponse et la teneur en APX chute (S₃).

La réhydratation des plantes au stade S₂ aboutit à un maintien voire à une faible augmentation de l'APX pour les plantes du genre *Vigna* et à une légère augmentation de l'APX pour celle du genre *Phaseolus*.

Analyse densitométrique de l'APX

Vigna unguiculata L.



Phaseolus vulgaris

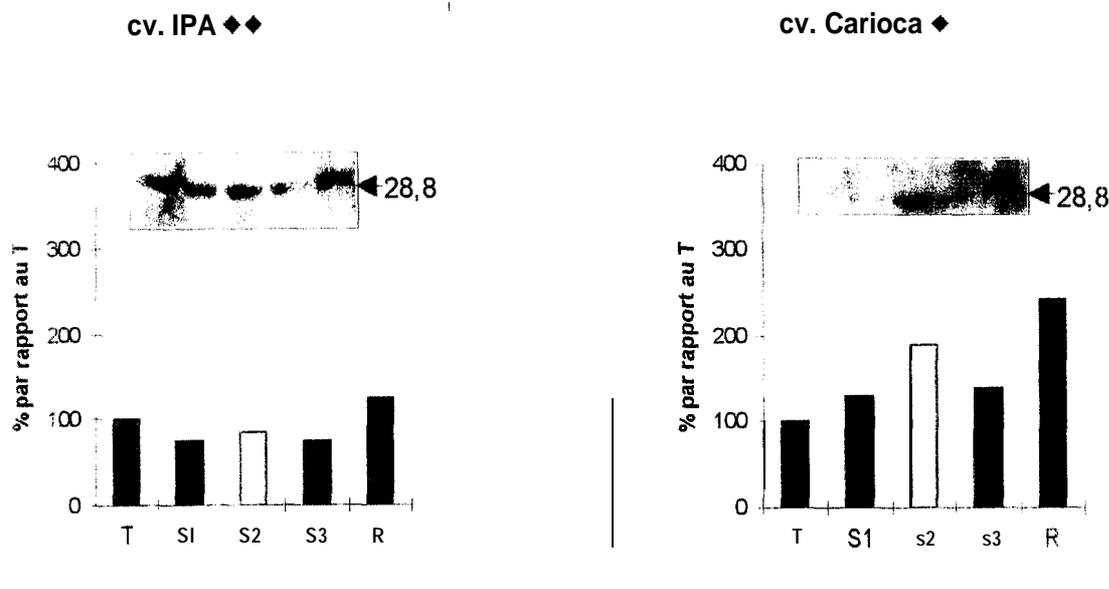


Figure 10: Evolution de la quantité d'APX estimée par analyse densitométrique sous l'effet du déficit hydrique chez les 4 cultivars EPACE, 1183, IPA et Carioca. T=plante bien hydratée ($\psi_w = -0.3$ MPa), S₁=déficit hydrique léger ($\psi_w = -1.0$ MPa), S₂=déficit hydrique moyen ($\psi_w = -1.5$ MPa), S₃=déficit hydrique sévère ($\psi_w = -1.8$ MPa) et R=rehydratation. Les résultats sont exprimés en % par rapport au témoin. Une quantité de 50 μ g de protéines est déposée par puits.

♦ : tolérance à la sécheresse en champ et au déficit hydrique

1 , TECHNIQUES

Le travail a été consacré en premier lieu à la mise au point d'un nouveau protocole d'immunodétection adapté à notre système expérimental. Les paramètres étudiés sont : le tampon d'extraction, l'électrotransfert et l'immunodétection.

1.1. Electrotransfert

La séparation des bandes protéiques qui a été obtenue grâce au gradient d'acrylamide 8-13% semble être plus efficace que les concentrations en acrylamide de 8, 10, 11.5 ou 13%. Ce gradient permet une diminution des mailles proportionnelle à la taille des protéines. De plus, le tampon de transfert contient du méthanol (20%) qui est un solvant très polaire. Le méthanol se comporte comme un dipôle $\text{CH}_3\text{-O}^-\text{H}^+$ et minimise les distorsions du gel tout en augmentant la capacité de liaison des protéines à la nitrocellulose (Hames, 1990). Le méthanol a aussi l'avantage de débarrasser les protéines du SDS (Bers et Garfin, 1985). Le retrait du SDS des protéines favorise un retour partiel de la protéine vers sa forme native. Cependant, le méthanol diminue l'efficacité d'élution des protéines du gel car il est responsable d'une diminution de la taille des mailles du gel (Bers et Garfin, 1985). Le gradient 8-13% nous permet ainsi de ne pas freiner les grosses molécules en obtenant des mailles plus grandes au niveau des hauts PM que pour un gel à 10, 11.5 ou 13% d'acrylamide. Néanmoins, malgré l'augmentation de la taille des mailles, le méthanol semble précipiter les protéines dans le gel (Bers et Garfin, 1985).

Pour contrecarrer cette diminution de l'efficacité de l'élution des protéines en présence de méthanol, le temps de transfert est augmenté. Une durée de transfert supérieure à 12 heures est recommandée pour éluer les protéines de haut poids moléculaire (>100 kDa) (Hames, 1990). Cependant, une durée de 24h n'a pas permis une élution complète.

L'autre paramètre qui influence la qualité de transfert est le voltage. Il s'applique suivant la taille des protéines recherchées (Lillehoj, 1994). Un voltage supérieur à 80 V n'a pas été utilisé dans notre cas, car à 80 V le transfert reste incomplet et de plus le tampon s'oxyde. De même, un voltage trop élevé risque de projeter les protéines de faibles PM à travers la membrane (Lillehoj, 1994).

D'autre part, l'efficacité du transfert semble ne pas être en rapport avec la quantité de protéines déposées par puits comme il est présenté dans la figure 4d. Cette efficacité pourrait être en rapport d'une part, avec le tampon d'extraction, d'autre part, avec le tampon de transfert, ou dépendre des deux tampons. Les différents tampons d'extraction testés pourraient contenir un constituant susceptible de réagir avec le méthanol et de favoriser ainsi la précipitation des protéines dans le gel.

1.2. Immunodétection

L'immunodétection s'est révélée difficile à mettre au point en raison de la grande quantité de protéines à haut PM dans nos extraits. Ces protéines représentent en effet 60 à 70% des protéines des feuilles il s'agit essentiellement de la grande sous-unité de la Rubisco (54 kDa). De plus, l'APX est peu représentée dans la cellule. Il est évident qu'une purification ménagée destinée à éliminer les protéines de PM > 50 kDa aurait amélioré la résolution électrophorétique sur petit gel. Cependant, nous avons tenu à rester au plus près des caractéristiques des extraits foliaires. d'où l'absence de purification. Cependant, en dépit des difficultés rencontrées, l'optimisation des paramètres intervenant dans la réalisation de l'électrophorèse, du ta ansfert et de la détection immunologique, a permis d'identifier et de quantifier une APX de 28.8 kDa qui semble correspondre à la protéine traduite à partir de l'ADNc isolé, cloné et séquencé dans notre laboratoire (Ferrari-Iliou et *al.*, en cours de rédaction).

L'augmentation de la concentration en protéine de blocage ou le changement de type de protéine bloquante n'a pas permis d'éliminer le bruit de fond d'autant plus que cela s'accompagne d'une diminution de l'affinité de l'antigène pour l'anticorps et ceci, jusqu'à la perte du signal. D'autre part, le Tween 20 (0.1%) utilisé dans la solution de blocage a pour rôle d'interférer avec la liaison des protéines à la membrane de nitrocellulose diminuant ainsi le bruit de fond et d'augmenter également l'efficacité du lavage (De Maio, 1994). Cependant, à cette concentration, ce détergent non ionique n'a pas permis de minimiser de manière efficace le bruit de fond dans notre cas.

Le nombre de lavages est par conséquent extrêmement important (Lane, 1994). Dans ce protocole, un lavage après révélation a été testé, néanmoins, celui-ci a souvent entraîné une disparition du signal.

Les bandes claires obtenues dans les autoradiographies présentées figures 5a et 5b semblent correspondre à des liaisons non spécifiques car la comparaison des autoradiographies avec la membrane de nitrocellulose colorée au rouge Ponceau révèle une superposition parfaite de ces bandes avec de fortes concentrations protéiques. En effet, nous avons utilisé un antisérum qui présente un certain nombre d'inconvénients. Cet antisérum, bien que contenant une forte concentration d'anticorps spécifiques, contient également des anticorps non spécifiques de la protéine étudiée. Ces anticorps non spécifiques peuvent réagir avec d'autres protéines. Ainsi, des bandes supplémentaires apparaissent pouvant interférer avec l'interprétation des résultats (Lane, 1994).

2. DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS

2.1. Caractérisation de l'APX par immunologie

Les travaux présentés ont permis l'identification d'une bande de 28.8 kDa correspondant à une APX putative. Plusieurs formes d'APX ont été identifiées dans différentes plantes: le Thé, les Epinards (Asada, 1992), le Potiron (Yamaguchi. et *al.*, 1995), dans des graines de légumineuses (Bunkelmann et Trelease, 1996). Dans ces conditions, il sera nécessaire de déterminer à quelle forme correspond l'APX de 28.8 kDa identifiée. La comparaison des extraits obtenus avec nos plantes, en présence ou en absence d'ascorbate (4 mM) a permis de déduire que cette isozyme pourrait correspondre à la cAPX. En effet, la sAPX et la tAPX du chloroplaste sont des enzymes qui sont rapidement hydrolysées en absence d'ascorbate protecteur (Chen et Asada, 1989, Miyake *et al.*, 1993). Dans notre cas, les extraits réalisés aussi bien en présence qu'en absence d'ascorbate (4 mM) montrent la même et unique bande d'APX. Cela nous permet de penser que la forme d'APX isolée pourrait être une cAPX.

Des travaux antérieurs effectués au laboratoire ont permis d'isoler et de séquencer un ADNc codant pour une cAPX (Ferrari-Iliou *et al.*, 1996) chez *Vigna*. Le logiciel PC Gene a permis de traduire la séquence nucléotidique de cet ADNc et d'obtenir un PM approché. La valeur de ce PM est: de 27 kDa et donc très voisin de celui estimé par l'électrophorèse dénaturante. Cette protéine est probablement un monomère correspondant à la cAPX. Par ailleurs, 18 clones positifs ont été isolés et séquencés dans la partie 5' de l'ADNc et révèlent une homologie de 100% avec l'ADNc de la cAPX isolé, cloné et séquencé en totalité (Ferrari-Iliou, communication personnelle).. Les amorces construites pour amplifier la sonde utilisée pour isoler la cAPX de la banque d'ADNc de *Vigna* devraient permettre d'isoler également une APX d'origine chloroplastique.

Les cellules végétales contiennent au moins 4 formes d'APX: cytosolique, stromatique, thylacoïdale et peroxysomale. La révélation d'une bande unique d'APX peut être aussi due au fait que la cAPX ne présente pas les mêmes épitopes que les autres formes d'APX comme cela a déjà été observé chez les feuilles d'Épinard (Tanaka et *al.*, 1991). Néanmoins, la plupart des isozymes d'APX présentent des réactions croisées avec un même antisérum car ils possèdent des épitopes communs (Chen et Asada, 1989; Mittler et Zilinskas, 1993; Yamaguchi et *al.*, 1995). La détection d'une seule bande pourrait également être liée à l'extraction. Elle pourrait ne pas être appropriée à la détection des APX liées aux membranes ou contenues dans des compartiments cellulaires tels que le chloroplaste, les peroxysomes ou la mitochondrie. En effet, Mittler et Zilinskas (1994) n'ont pas réussi à détecter par immunologie la forme chloroplastique de l'APX bien que le transcrit correspondant ait été mis en évidence auparavant (Mittler et Zilinskas, 1994).

3.2 Relation entre la quantité d'APX détectée et la tolérance au déficit hydrique chez les 4 cultivars

Le système expérimental utilisé a été caractérisé d'après les études agronomiques réalisées en champs en conditions de sécheresse (Monteiro de Paula, 1992, Thèse de Doctorat) et d'après les travaux réalisés au laboratoire portant sur la réponse cellulaire à une contrainte hydrique contrôlée (Zuily-Fodil *et al.*, 1990; Pham Thi *et al.*, 1990). L'ensemble de ces résultats montrent que les *Vigna* sont plus tolérantes au déficit hydrique que les *Phaseolus*. Chez les deux genres, les cultivars sensibles au déficit hydrique contiennent plus de protéines solubles en mg/gPF à l'état témoin que les cultivars tolérants. Cela confirme les travaux de Zuily-Fodil *et al.*, (1990) qui montrent que les protéines des plantes appartenant au genre *Phaseolus* sont plus sensibles au déficit hydrique que celles des plantes appartenant au genre *Vigna*.

Les résultats présentés ici concernent une première quantification de l'APX chez ces plantes en réponse à un déficit hydrique contrôlé.

Chez *Vigna*, le cultivar EPACE réagit dès le début de l'application du déficit hydrique par une augmentation de la quantité d'APX. Par contre chez le cultivar 1183, il faut appliquer un déficit hydrique plus intense pour observer une augmentation de l'APX. La diminution observée lors d'un déficit hydrique léger peut être considérée comme une réponse au choc hydrique se manifestant, d'une part, par un ralentissement des mécanismes cellulaires protecteurs et d'autre part, par l'induction d'un stress oxydant. En S2, le cultivar 1183 réagit en augmentant la quantité d'APX. Ceci pourrait correspondre au déclenchement du phénomène de tolérance après le choc en S1. D'autre part la latence observée dans l'induction de l'APX pourrait être due, comme dans le cas des plantules de Tournesol (Sgherri et Navari-Izzo, 1995), à une induction tardive des mécanismes de défense en réponse à des dommages oxydatifs élevés. La plante augmente par conséquent sa quantité d'enzymes pour lutter contre les dommages oxydatifs, avec un décalage, par rapport à la plante plus tolérante (EPACE).

En ce qui concerne *Phaseolus*, le cultivar IPA, après un choc en S1 semble retrouver le même niveau d'APX que celui du témoin. Par contre chez le cultivar Carioca, le plus sensible, la quantité d'APX augmente dès le début de l'induction du stress hydrique.

La résistance d'EPACE pourrait être liée à l'augmentation progressive de la quantité d'APX disponible en fonction de l'intensité du déficit hydrique et la sensibilité de 1183 par rapport à EPACE à son faible taux d'APX. Le genre *Vigna* semblerait augmenter la teneur en APX cellulaire pour lutter efficacement contre le stress oxydant. Au contraire, dans le cas des *Phaseolus*, il semble que quelque soit le mode de lutte, augmentation ou maintien du niveau de l'APX, les cultivars ne résistent pas à des stress oxydants élevés. Ainsi, Carioca, en dépit de l'augmentation du taux d'APX, semble ne pas réaliser une détoxification efficace. Les plantes du genre *Vigna* semblent ainsi posséder une aptitude à se défendre contre l'attaque par les EAO alors que les plantes du genre *Phaseolus* semblent entrer dans un processus de sénescence irréversible.

Cette étude concernant une première quantification de l'APX pendant un déficit hydrique contrôlé (de ψ_w -0.2 MPa à ψ_w -1.8 MPa) peut être corrélée aux résultats obtenus d'une part pour la concentration d'ARNm stationnaire du gène putatif de l'APX caractérisé dans notre laboratoire et d'autre part sur l'activité de l'APX. En effet, ces paramètres ont été étudiés dans les mêmes conditions expérimentales (T, S1, S2, S3, R).

	<i>Vigna unguiculata</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	EPACE	1183	IPA	Carioca
Tolérance	◆◆◆◆	◆◆◆	◆◆	◆
Concentration stationnaire d'ARNm d'APX	◆◆	◆◆◆◆	◆◆	◆◆
Activité de l'APX	◆◆	◆◆◆◆	◆	◆
Quantité d'APX	◆◆◆◆	◆◆	◆	◆◆◆

Cas de *Vigna unguiculata*

Cultivar EPACE

Ce cultivar est le plus résistant à la sécheresse et l'analyse de la concentration stationnaire des ARNm a montré que, chez EPACE, la quantité d'ARNm codant pour l'APX diminue en S1 avant d'augmenter et de se maintenir au même niveau que le témoin (Ferrari-Iliou *et al.*, en cours de rédaction). Par ailleurs, la mesure de l'activité chez EPACE ne montre pas de variations entre le témoin bien hydraté et les plantes soumises au déficit hydrique néanmoins, c'est également celui qui subit la plus forte augmentation des quantités d'APX en S2 et S3 par rapport au témoin.

Cultivar 1183

Ce cultivar tolère moins bien la sécheresse que le précédent. La concentration stationnaire des ARNm codant pour l'APX cytosolique augmente progressivement en réponse au déficit hydrique (Ferrari-Iliou *et al.*, 1996). Chez 1183, l'activité augmente de 75% en S2 par rapport au témoin avant de rediminuer en S3. La quantité d'APX diminue en S1 puis augmente en S2 et en S3 par rapport au témoin. Ce cultivar semble posséder une aptitude à s'adapter au stress oxydant induit par le déficit hydrique en modulant l'APX.

Cas du genre *Phaseolus*

Cultivar IPA

Ce cultivar est moyennement sensible à la sécheresse, la concentration stationnaire des ARNm ne présente aucune variation significative sous l'effet du déficit hydrique (Ferrari-Iliou *et al.*, en cours de rédaction). Par contre, l'activité évolue parallèlement à la quantité d'APX détectée en fonction de l'intensité du déficit hydrique. La quantité de protéines en réponse au déficit hydrique moyen (S2) reste faible par rapport au témoin et diminue pour un déficit hydrique sévère (S3). IPA semble ainsi ne pas pouvoir résister à un déficit trop sévère.

Cultivar Carioca

Aucune différence significative, en réponse au déficit hydrique, n'a été observée en ce qui concerne la concentration stationnaire des ARNm de l'APX chez ce cultivar, le plus sensible à la sécheresse (Ferrari-Iliou *et al.*, en cours de rédaction). L'activité de l'APX chez Carioca diminue de 50% par rapport au témoin bien hydraté en réponse au déficit hydrique cependant, la quantité d'APX détectée augmente jusqu'au point S2. Malgré cela, Carioca ne résiste pas au déficit hydrique sévère.

D'après nos résultats il semblerait que chez le genre *Vigna*, le déficit hydrique module la concentration stationnaire des ARNm, l'activité enzymatique, et la quantité de protéines par rapport au témoin. Les 2 cultivars EPACE et 1183 fonctionnent de façon opposée en ce qui concerne la concentration stationnaire des ARNm codant pour l'APX et l'activité correspondante. Par contre chez ces 2 cultivars la quantité d'APX détectée évolue dans le même sens. Cependant il existe une différence quantitative entre ces 2 cultivars en réponse au déficit hydrique: chez EPACE, la quantité de protéines est fortement augmentée par rapport au témoin et chez 1183 cette augmentation est moins importante. Inversement, en ce qui concerne l'activité et la concentration stationnaire des ARNm, c'est chez 1183 que l'on observe la plus forte augmentation (Ferrari-Iliou *et al.*, 1996).

Chez le genre *Phaseolus*, le déficit hydrique n'a que peu d'effet sur la concentration stationnaire des ARNm du gène et l'activité de l'enzyme APX. En ce qui concerne la quantité de protéines, elle est fortement augmentée chez Carioca par rapport au témoin et IPA tend à conserver une quantité de protéines identiques à celle du témoin.

L'analyse des résultats obtenus chez les 4 cultivars étudiés nous permet de les classer en 2 groupes distincts bien que ces 2 groupes associent des genres différents.

Ces 2 groupes sont constitués d'une part de 1183 et d'autre part, des cultivars EPACE, IPA et Carioca. Le cultivar 3183 présente un comportement unique avec l'induction des ARNm codant pour l'APX dont le profil d'évolution précède dans le temps celui de la quantité d'APX détectée. La diminution de la quantité de protéines en S1, chez 1183, pourrait être due à une dégradation des protéines à l'origine de précurseurs nécessaires à la synthèse de nouvelles protéines utilisées lors de la phase de tolérance au déficit hydrique. En S3, la diminution de l'activité précède celle de la quantité d'enzyme détectée. Cela suggère que l'activité est plus sensible au déficit hydrique que la quantité de protéines.

En ce qui concerne les 3 autres cultivars, la concentration stationnaire des ARNm n'est pas réellement modulée par le déficit hydrique, néanmoins, la quantité d'enzyme détectée tend à augmenter sous l'effet du déficit hydrique. Les cultivars EPACE et Carioca pourraient accumuler des précurseurs d'APX afin d'augmenter la quantité d'enzymes détoxifiantes et ce, dès l'application du déficit hydrique. Cette réserve de précurseurs chez ces 2 cultivars pourrait expliquer le fait que la quantité d'APX augmente progressivement au cours du déficit hydrique. D'autre part, la sensibilité de Carioca pourrait être due à une forte présence d'EAO qui, malgré l'augmentation de la quantité d'APX ne sont pas détoxifiées de manière efficace. Pour le cultivar IPA, un temps de **latence** est observé, qui suggère que la mise en place des défenses antioxydantes n'est nécessaire que lorsque les cellules ont dépassé une quantité d'EAO supportable. Il semble y avoir chez EPACE tout comme chez Carioca une accumulation de l'APX sans qu'il y ait pour cela une augmentation de l'activité. Chez ces 2 cultivars quelle que soit la quantité d'APX présente dans le système, l'activité de l'enzyme ne dépasse pas celle du témoin.

2.3. Relation entre la quantité d'APX et la réhydratation chez les 4 cultivars

La plupart des dommages occasionnés par la déshydratation pourraient se manifester au cours de la réhydratation quand la plante retrouve des activités cataboliques et/ou anaboliques normales (Sgherri et *al.*, 1994). La plante a alors besoin de produire plus d'antioxydants pour lutter contre la production accrue d'EAO en réponse au déficit hydrique. Suite à nos travaux, nous montrons qu'en effet, la réhydratation aboutit à une quantité d'APX supérieure à celle observée chez les 4 cultivars bien hydratés. Cela est d'autant plus surprenant pour IPA qui est le seul cultivar à posséder une quantité d'APX en S2 inférieure à celle du témoin. Par rapport à S2, les 2 cultivars de *Vigna* (EPACE et 1183) possèdent une quantité d'APX proche de celle observée pour S2 alors que les 2 cultivars de *Phaseolus* (IPA et Carioca) montrent une nette augmentation par rapport à ce point.

Chez les *Phaseolus*, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle la plante a besoin de plus d'APX pour faire face à dommages oxydatifs occasionnés par la réhydratation. En effet, Sgherri et *al.* (1994) ont montré que chez *Boea hygroskopica*, une mousse reviviscente, les processus oxydatifs s'intensifient lors de la réhydratation et celle-ci semble être plus exposée à l'attaque par les EAO. En ce qui concerne *Vigna*, on pourrait supposer que les plantes ont accumulé suffisamment d'enzymes antioxydantes pour ne pas avoir besoin d'en synthétiser davantage après réhydratation. En effet, Sgherri et *al.* (1994) ont montré une accumulation d'antioxydants tel que l'ascorbate et le glutathion réduit pendant la déshydratation mais aussi au cours de la réhydratation. Cette accumulation d'antioxydants impliqués dans la détoxification de H₂O₂ par le cycle enzymatique glutathion/ascorbate/NADPH dans lequel l'APX est l'une des enzymes clés pourrait permettre à la plante de tolérer les dégâts oxydatifs qui se produisent durant le déficit hydrique. Cette accumulation d'antioxydants réalisée au cours du déficit hydrique lui permettrait aussi de constituer un pool utilisable pendant la réhydratation quand les dégâts causés doivent être réparés rapidement et que la transcription implique un temps de **latence** dans la réponse.

Les résultats obtenus ici apportent un complément d'information quant au comportement des 4 cultivars vis à vis du stress oxydant induit par le déficit hydrique. En effet, l'étude de l'activité enzymatique et de la concentration stationnaire des ARNm du gène ne permettent pas à elles seules de conclure quant au type de régulation de l'enzyme **chez** les 4 cultivars. L'immunodétection et l'immunoquantification préliminaires de l'APX apportent une information **complémentaire** pour la compréhension des mécanismes de défense des plantes soumises à un déficit hydrique contre le stress oxydant.

L'immunodétection a été confrontée à un problème de bruit de fond qui dans cette étude, n'a pas été résolu. L'amélioration du bruit de fond passe par l'utilisation d'autres protéines bloquantes comme la caséine. L'augmentation de la concentration du Tween 20 pourra être également envisagée. Cependant, à forte concentration (>0.5%) ce détergent pourrait détacher les protéines de la membrane surtout si elles sont faiblement concentrées (De Maio, 1994). D'autre part, il serait intéressant d'utiliser des anticorps polyclonaux purifiés par immunoaffinité. Ceci nécessiterait cependant de disposer de l'antigène sous forme purifiée. D'un autre côté, l'immunodétection pourrait être associée à l'immunoprécipitation qui permet de détecter des antigènes peu abondants. En effet, si le manque de détection des autres isozymes est liée à la quantité de protéines, l'immunoprécipitation pourrait représenter une solution. Par contre, si cela est dû au type d'extraction utilisé, l'extraction pourrait être réalisée en présence de détergent pour libérer les formes membranaires et celles contenues dans les organelles. Cela permettrait peut être de déterminer le nombre d'isozymes d'APX présentes dans les cellules de feuilles de *Vigna* et de *Phaseolus* et d'envisager leur localisation.

Le déficit hydrique active la production d'EAO, de radicaux libres oxygénés et par effet rebond de l'H₂O₂. En vue de protéger les constituants cellulaires et de conserver sa compartimentation, il est important de protéger les membranes de la peroxydation. Cette protection se fait par l'action des enzymes détoxifiantes parmi lesquelles la SOD et l'APX (Smirnov et Colombe, 1988; Tanaka et al., 1990; Perl-Treves et Galun, 1991; Mittler et Zilinskas, 1992).

La forme d'APX caractérisée dans les conditions d'extraction et d'immunodétection définies au cours de ce travail est une APX cytosolique qui semble être un monomère. La quantité de cAPX est modulée par l'état hydrique de la plante. **Elle tend à augmenter jusqu'à un déficit hydrique moyen pour tous les cultivars. Cependant, on a pu observer une augmentation de la cAPX jusqu'à un déficit hydrique sévère chez les cultivars résistants à la sécheresse et jusqu'à un déficit hydrique moyen, chez les sensibles.**

La tolérance au déficit hydrique dans notre système semble dépendre de plusieurs facteurs et en particulier de l'accumulation de protéines qui exercent une fonction protectrice dans tous les compartiments cellulaires. Parmi ces protéines, la cAPX semble jouer un rôle primordial dans la résistance des Haricots appartenant aux genres *Vigna* et *Phaseolus* que nous avons testé. Sous l'effet du stress hydrique, de grandes quantités d'H₂O₂ sont produites et il a été montré que la cAPX joue un rôle important dans sa détoxification (Miffler et Zilinskas, 1992; Thomsen et al., 1992). Les chloroplastes sont considérés comme le site principal de production d'EAO de la cellule végétale d'abord par les travaux de Melher et ses collaborateurs (Melher, 1951) et ensuite par la découverte de la voie de Asada et Halliwell dans des chloroplastes intacts isolés (Asada, 1992). Des travaux récents ont montré que la APX et les isozymes de la SOD répondent à plusieurs types de stress qui font intervenir en premier lieu la production d'EAO dans les chloroplastes (Perl-Treves et Galun, 1991; Mittler et Zilinskas, 1992.; Thomsen et al., 1992). Les chloroplastes sont de plus, très sensibles à l'H₂O₂ extrachloroplastique (Asada, 1992), ce qui rend les mécanismes de détoxification de l'O₂[•] et l'H₂O₂ dans le cytosol très importants, Ceci permet le maintien d'un rendement photosynthétique acceptables et l'atténuation des dégâts cellulaires provoqués dans certaines conditions de stress (Miffler et Zilinskas, 1994).

L'activité de l'APX dépend des autres enzymes du cycle ascorbate/glutathion. La détoxification de l'H₂O₂ par l'APX se fait suivant la réaction suivante :



L'ascorbate est régénéré de manière constante à partir du monodéhydroascorbate (MDHA) par la MDHA réductase NAD(P)H-dépendante. Deux molécules de MDHA peuvent aussi interagir pour donner une molécule d'ascorbate et une de déhydroascorbate (DHA). Le DHA formé est réduit à son tour en ascorbate par le glutathion réduit (GSH) lors de la réaction catalysée par la GSH réductase (GR). Le GSH oxydé est à son tour réduit par la GR NADP-dépendante. Une des enzymes de ce cycle pourrait ralentir ou bloquer tout le cycle (Smirnoff, 1993). Cela expliquerait que l'accumulation de la cAPX ne suffisent pas pour une détoxification efficace,

La résistance d'EPACE par rapport à 1183 et IPA pourrait être liée à l'accumulation rapide de l'APX en réponse au déficit hydrique. Ce type de régulation n'explique cependant pas tout le phénomène de résistance d'EPACE puisque l'activité n'excède pas celui du témoin lors d'un déficit hydrique même sévère. Par contre la sensibilité de Carioca pourrait être liée à une défaillance dans l'une des enzymes du cycle ascorbate/glutathion.

Des plants de Tabac ont été transformés pour le gène codant pour la cAPX. La suppression d'une partie de l'expression du gène de la cAPX par l'utilisation d'ARN antisens augmente la sensibilité du Tabac transformé au stress oxydant induit par l'ozone (Örvar et Ellis, 1997). La suppression de l'expression de ce gène entraîne une diminution de l'activité enzymatique de la cAPX. Ce résultat montre une fois de plus que la cAPX est indispensable à la protection contre le stress oxydant. Par contre, la surexpression de l'APX dans les chloroplastes de Tabac ne permet pas une protection supplémentaire des plantes soumises au stress oxydant généré par l'ozone (Torsethagen et *al.*, 1997). On peut émettre 2 hypothèses : soit l'APX chloroplastique n'est pas l'enzyme fondamentale nécessaire à la détoxification de l'H₂O₂ produit au niveau cellulaire, soit l'APX chloroplastique a besoin des autres enzymes du cycle pour fonctionner. En effet, les APX sont les enzymes clés du cycle ascorbate-glutathion et seule la transformation multigénique des plantes pour les 4 enzymes concernées (l'APX, la GR et la MDHAR et/ou DHAR) pourrait apporter une réponse.

Par ailleurs, des tentatives de surexpression chez le Tabac du gène codant pour la Cu/Zn SOD de Pétunia n'ont pas abouti à renforcer la protection contre les effets délétères de l'ozone (Pitcher et *al.*, 1991). Par contre, d'autres travaux concernant la surexpression de la GR chez les Peupliers transgéniques montrent que les transformants sont plus résistants à la photoinhibition (Foyer et *al.*, 1995).

La résistance au stress oxydant implique des mécanismes complexes et multifactoriels dont la compréhension pourrait apporter de nouvelles informations concernant les phénomènes impliqués dans la protection cellulaire vis à vis des EAO.

Tampon d'extraction - - -Tampon phosphate 50 mM (0.7.8)

	concentration	masse à peser ou volume
Monohydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4)	120 mM	3.54 ml
Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	100 mM	47.75 ml
EDTA	2 mM	186 mg
YMSF	0.5 mM	87.1 mg
Leupeptine	5 μ g/l	125 μ l
Ascorbate de sodium	2 mM	99 mg
ajuster le pH avec du KOH (5 M)		
Eau milliQ (millipore) qsp		250 ml

Tampon Tris 50 mM (pH 7.8)

Tris (HCl)	50 mM	1514 mg
EDTA	2 mM	186 mg
PMSF	0.5 mM	87.1 mg
Leupeptine	5 μ g/l	125 μ l
Ascorbate de sodium	4 mM	198 mg
Eau milliQ (millipore) qsp		250 ml

Electrophorèse de protéines en SDS-PAGE

Préparation des gels

Running gel : proportion pour un gel pH 8.8

	Gel d'acrylamide à différentes concentrations					
	8%	13%	11.5%	10%	gradient 8%	13%
Acryl/ Bis Acryl (40%) (ml)	1	1.625	1.438	1.25	0.563	0.914
Tris-HCl (1M, pH 8.8) (ml)	2	2	2	2	1.125	1.125
SDS (5%) (µl)	100	100	100	100	56.25	56.25
Persulfate (10%) (µl)	50	50	50	50	30	30
Temed (µl)	5	5	5	5	4	4
Eau (ml)	1.85	1.225	1.413	1.6	1.041	0.689

Stacking gel : proportion pour un gel de 3.5% pH 6.8

Acryl/ Bis Acryl (40%) (µl)	218.8
Tris-HCl (0.5M, pH 8.8) (µl)	275.8
SDS (5%) (µl)	50
Persulfate (10%) (µl)	50
Temed (µl)	5
Eau (ml)	1.928

Tampon Caemlli

Tris-HCl pH 6.8	0.5 M	1 ml
Clycérol	10%	0.8 ml
SDS	10%	1.6 ml
2-β-mercaptoéthanol	5%	0.4 ml
Bleu de bromophénol	0.05%	0.2 ml
Eau milliQ (millipore) ysp		8 ml

Tampon d'électrophorèse 5X

Tris	124 mM	15 g
Glycine	959 mM	72 g
SDS	17 mM	5 g
Eau milliQ (millipore) qsp	1000 ml	

Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Tampon de transfert

Tris-HCl pH 8-8.4	25 mM	3.03 g
Glycine	192 mM	14.4 g
Méthanol	20% v/v	200ml
Eau milliQ (millipore) qsp	1000ml	

Coloration au rouge Ponceau

Solution de coloration

Rouge Ponceau S	0.1%
Acide acétique	5%

Coloration au bleu de Coomassie

Solution de coloration

Bleu de Coomassie	0.2%	750 mg
Méthanol / Ethanol	36%	135 ml
Acide acétique	26%	100 ml
Eau milliQ (millipore)	37%	138 ml

Solution de décoloration

Méthanol	40%	400 ml
Acide acétique	10%	100 ml
Eau milliQ (millipore)	50%	500 ml

Immunodétection

Les tampons de l'immunodétection se conservent à 4°C pendant plusieurs mois

Tampon de lavages TTBS ("Tris-buffered saline-Tween")

Tris	100mM	6.05 g
NaCl	0.9%	4.5 g
Tween 20	0.1%	500 µl
pH 7.5 (ajuster par HCl)		
Eau milliQ (millipore) qsp	500 ml	

Tampon de blocage

SAR	1%	2 g
TTBS qsp	200 ml	

Tampon de nettoyage

Tris	42.5 mM	7.57 g
SDS	2%	20 g
2- β -mercaptoéthanol	100 mM	7 ml
pH 6.2 (ajuster avec HCl)		
Eau milliQ (millipore) qsp 1000 ml		

Anderson, J.M. et Beardall, J., 1991.. Molecular activities of plant cells. *Dans An introduction to plant biochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Asada, K. et Takahashi, M., 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Dans Photoinhibition*. Kyle, D.J., Osmond, C.B. et Arntzen, C.J., eds., Elsevier Amsterdam. 227-287.

Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants, *Physiol. Plant.*, **108**, 1151-1160.

Bers, G. et Garfin, D.; 1985. *Biotechniques*, **3**, 276

Bewley, J.D., 1981. Protein synthesis. *Dans Physiology and biochemistry of drought resistance in plant*, Paleig, L.G., and Aspinall, P., eds., New York Academic Press. 261-282.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Bunkelmann, J. et Trelease, R.N., 1996. Ascorbate peroxidase : a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol.*, **110**, 589-598.

Chen, G. X. et Asada, K.; 1989. Ascorbate peroxidase in Tea leaves : occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.*, **30** (7), 987-998.

D'Arcy-Lameta, A., Ferrari-Iliou, R., Pham Thi, A.T., Lemoine, Y. et Zuily-Fodil, Y., 1996. Involment of photosynthetic pigments in total bean leaf lipid extract sensitivity to photoperoxidation. *Plant Physiol. Biochem.*, **34** (6), 817-825.

Dalton, D.A., Hanus, F.J., Russell, S.A. et Evans, H.J., 1987. Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules. *Plant Physiol.*, **83**, 789-794.

De Maio, A., 1994. Using nitrocellulose membranes. *Dans Protein blotting. A practical approach*. ed Dunbar, B.S., Oxford University Press, New York, 11-32.

El-Hafid, L., Pham Thi, A.T., Zuily-Fodil, Y. et Vieira da Silva, J., 1989. Enzymatic breakdown of polar lipids in Cotton leaves under stress ; degradation of monogalactosyl-diacylglycerol. *Plant Physiol. Biochem.*, **27**, 495-502.

Elia, m.r., Borracino, G. et Dipierro, S., 1992. Soluble ascorbate peroxidase from Potato tubers. *Plant Sci.*, **85**, 17-21.

Efstner, E.F., Wagner, G.A. et Schutz, W., 1988. Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. Dans **Current topics in plants biochemistry and physiology**. eds, Randall, D.D., Blevins, D.G. et Campbell, W.H., University of Missouri, 7, 159-187.

Ferrari-Iliou, R., d'Arcy-Lametta, A., Iliou, J.P., Pham Thi, A.T., Monteiro de Paula, F., Vieira da Silva, J., et Mazliak, P., 1993. *In vitro* photodynamic lipid peroxidation of total lipophilic extracts from leaves of Bean plants. *Biochem. Biophys. Acta*, **1166**, 48-54.

Ferrari-Iliou, R., El Maarouf, H., Pham Thi, A.T., d'Arcy-Lameta, A., Gareil, M. et Zuily-Fodil, Y., 1996. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a Cowpea ascorbate peroxidase and gene expression under drought. 10th FESPP Congress, Florence, Italy, September 9-13, *dans* From molecular mechanisms to the plant : an integrated approach. *Plant Physiol. Biochem.*, special issue, 237.

Ferrari-Iliou, R., Pham Thi, A.T. et Vieira da Silva, J., 1984. Effect of water stress on lipid and fatty acid composition of Cotton (*Gossypium hirsutum*) chloroplasts. *Physiol. Plant.*, **62**, 219-224.

Foyer, C.H. et Harbinson, J., 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. Dans Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Foyer, C.H. et Mullineaux, P.M., ed, CRC press, Boca Raton, 1-41.

Foyer, C.H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K.J., Pruvost, C. et Jouanin, L., 1995. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in Poplar trees. *Plant Physiol.*, **109**, 1047-1057.

Halliwell, B. et Gutteridge, J.M.C., 1989. Protection against radical damages : systems with problems. Dans Free radicals in biology and medicine. Halliwell, B. et Gutteridge, J.M.C., ed, Clarendon Press, Oxford, 277-298.

Hames, B.D., 1990. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Dans Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. eds, Hames, B.D. et Ric'kwood, D., Oxford University Press, Oxford, 1-147.

Harlow, E. et Lane, D., 1991. Anticor]ps, un manuel de laboratoire. Editions Pradel, Paris.

Ireland, C.R., Baker, N.R. et Long, S.F., 1985. The role of carbon dioxide and oxygen in determining chlorophyll fluorescence quenching during leaf development. *Planta*, **165**, 477-485.

- Jimenez, A., Hernandez, J.A., Del Rio, L.A. et Sevilla, F., 1997. Evidence for the presence of the ascorbate/glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of Pea leaves. *Plant Physiol.*, 114 (1), 275-284.
- Kaiser, W.N., 1979. Reversible inhibition of the Calvin cycle and **activation** of the oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta*, 145, 377-382.
- Koshiba, T., 1993. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiol.*, 34, 713-721.
- Krause, G.H., Koster, S. et Wong, S.C., 1985. Photoinhibition of photosynthesis under anaerobic conditions studied with leaves and chloroplasts of *Spinacia oleracea* L. *Planta*, 265, 430-438.
- Laemmli, U.K.; 1970. Cleavage of structural **proteins** during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lillehoj, E.P.; 1994. **Protein** blotting. *Dans* Antibodies techniques. eds Malik, V.S. et Lillehoj, E.P., Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 273-289.
- Mehler, A.H., 1951. Studies **on** reaction of illuminated chloroplasts 1. Mechanisms of the reduction of oxygen and other **Hill** reagents. *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 65-77.
- Mittler, R. et Zilinskas, B.A., 1991. Purification and characterization of Pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol.*, 97, 962-968.
- Mittler, R. et Zilinskas, B.A., 1992. **Molecular** cloning and characterization of a gene encoding Pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.*, 267, 21802-21807.
- Mittler, R. et Zilinskas, B.A., 1993. **Detection** of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent **reduction** of nitroblue tetrazolium. *Anal. Biochem.*, 215, 540-546.
- Mittler, R. et Zilinskas, B.A., 1994. Regulation of Pea cytosolic ascorbate and other **antioxidant** enzymes **during** the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J.*, 5 (3), 397-405.
- Miyake, C., Wan-Hong, C. et Asada, K., 1993. Purification. and molecular properties of the thylakoid-bound ascorbate peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 34 (6), 881-889.
- Monteiro de Paula, F., Pham Thi, A.T., Viera da Silva, J., Justin, A.M., Demandre, C. et Mazliak, P., 1990. **Effects** of water stress on the molecular composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. *Plant Science*, 66, 185-193.

Monteiro de Paula, F., 1992. Rôle des espèces moléculaires de lipides membranaires dans la résistance à la sécheresse chez le niébé (*Vigna unguiculata* L.). *Thèse de Doctorat* soutenue à l'Université Paris 7.

Monteiro de Paula, F., Pham Thi, A.T., Zuily-Fodil, Y., Ferrari-Iliou, R., Vieira da Silva, J. et Mazliak, P., 1993. Effects of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiol. Biochem.*, 31 (5), 707-715.

Mullen, .R.T. et Treàese, R.N., 1996. Biogenesis and membrane properties of peroxisomes : does the boundary membrane serve and protect ? *Trends in plant science*, 1 (11), 389-394.

Nair, V., Cooper, C.S., Vietti, D.E. et Turner, G.A. 1986. The chemistry of lipid peroxidation metabolites : crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids*, 21, 6-10.

Nakano, Y. et Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22, 867-880.

Nakano, Y. et Asada, K., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in Spinach chloroplasts ; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*, 28, 131-140.

Örvar, B.L. et Ellis, B.E., 1997. Transgenic Tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *Plant J.*, 11 (6), 1297-1305.

Patterson, W.R. et Poulos, T.L., 1995. Crystal structure of recombinant Pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry*, 34, 4331-4341.

Perl-Treves, R. et Galun, E., 1991. The Tomato Cu, Zn-superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* 17, 745-760.

Pham Thi, A.T., Vieira da Silva, J. et Mazliak, P., 1990. The role of membrane lipids in plants resistance to water stress. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 137, 99-114.

Piette, J., 1991. Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 11, 241-260.

Pitcher, L.H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J.M. et Zilinskas, B.A., 1991. Overproduction of *Petunia* chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic Tobacco. *Plant Physiol.*, 97, 452-455.

Price, A.H., Atherton, N.M. et Hendry, A.F., 1989. Plants under drought-stress generate activated oxygen. *Free Radic. Res. Commun*, 8, 61-66.

- Roberts, D.R., Kristie, D.N., Thompson, J.E., Dumbroff, E.B. et Gepstein, S., 1991. *In vitro* evidence for the involvement of activated oxygen in light-induced aggregation of thylakoid proteins. *Physiol. Plant.*, **82**, 389-396.
- Robinson, J.M., 1988. Does oxygen photoreduction occur in vivo? *Physiol. Plant.*, **72**, 666-680.
- Roy Macauley, R., Zuily-Fodil, Y., Kidric, M., Pham Thi, A.T. et Vieira da Silva, J., 1992. Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiol. Plant.*, **85**, 90-96.
- Sgherri, C.L.M. et Navari-Izzo, F., 1995. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress : oxidative stress and defence mechanisms. *Physiol. Plant.*, **93**, 25-30.
- Sgherri, C.L.M., Loggini, B., Bochicchio, A. et Navari-Izzo, F.; 1994. Antioxidant system in *Boea hygroskopica* : changes in response to desiccation and rehydration. *Phytochemistry*, **37**(2), 377-381.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. et Maizel, J.V., 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815-820.
- Shigeoka, S., Nakano, Y. et Kitaoka, S., 1980. Purification and some properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis* z. *Arch. Biochem. Biophys.* **201**, 121-127.
- Smirnoff, N. et Colombe, S.V., 1988. Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. *J. Exp. Bot.*, **39**, 1097-1108.
- Smirnoff, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.*, **125**, 27-58.
- Tanaka, K., Masuda, R., Sugimoto, T., Omasa, K. et Sakaki, T., 1990. Water deficiency-induced changes in the contents of defensive substances against active oxygen in spinach leaves. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2629-2634.
- Tanaka, K., Otsubo, T. et Kondo, N., 1982. Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of Calvin-cycle SH enzymes in SO₂-fumigated Spinach leaves. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1009-1015.
- Tanaka, K., Takeuchi, E., Kubo, A., Sakaki, T., Haraguchi, K. et Kawamura, Y.; 1991. Two immunologically different isozymes of ascorbate peroxidase from Spinach leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **286** (2), 371-375.
- Thomsen, B., Drumm-Herrel, H. et Mohr, H., 1992. Control of the appearance of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) in Mustard seedlings cotyledons by

phytochrome and photooxidative treatments. *Planta*, **186**, 600-608.

Torsethaugen, G., Pitcher, L.H., Zilinskas, B. et Pell, E.J., 1997. Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. *Plant Physiol.* **114**, 529-537.

Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., P'ham Thi, A.T. et Vieira da Silva, 1990. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *J. Exp. Bot.*, **228**, 827-832.

Weber, K. et Osborn, M., 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.

Yamaguchi, K., Mori, H. et Nishimura, M.; 1995. A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in Pumpkin. *Plant Cell Physiol.*, *JSP*, **36(6)**, 1157-1162.

Zuily-Fodil, Y., Vasquez-Tello, A. et Vieira da Silva, J., 1990. Effect of water deficit on cell permeability and on chloroplast integrity. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **137**, 115-123.