

CR000456

RAPPORT DE MISSION

Laboratoire de Physiologie et
d'Agrotechnologies Végétales

**Université Libre de Bruxelles
(BELGIQUE)**

Convention G62-21-30/10/1995

Période : du 27 novembre 1997 au 26 février
1998

par

Dr Macoumba DIOUF

Chercheur, CERAAS

Introduction

Dans le cadre du projet "Mécanismes physiologiques de l'adaptation à la sécheresse et création variétale pour les régions sèches" Référence G62-21-30/10/1995, le Laboratoire de Physiologie et d'Agrotechnologies Végétales (LPAV) de l'Université Libre de Bruxelles (ULB) conduit des recherches d'une part, sur les conséquences du déficit hydrique sur l'organisation et le fonctionnement de l'appareil photosynthétique, et d'autre part, sur les mécanismes de défense développés par les plantes face à cette contrainte.

L'objectif principal de ces recherches est d'affiner la compréhension des mécanismes biophysiques, biochimiques, et moléculaires de la résistance des légumineuses tropicales cultivées à la sécheresse. Les connaissances acquises permettent de proposer des critères plus pertinents utilisables pour la sélection et la création variétale, en vue de l'amélioration de la production.

Ainsi, dans le cadre des séjours d'échanges scientifiques entre le CERAAS et l'ULB, nous avons effectué une mission au LPAV dirigé par le Prof Jean-Paul Delhaye pendant la période du 27 novembre 1997 au 26 février 1998. Pendant cette mission, nous avons mené en collaboration avec Dr Murielle Eyletters et Mr Yao Casimir Brou, une expérimentation en serre sur le thème : "Conséquences physiologiques, biochimiques et moléculaires du déficit hydrique chez le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Mouride) et le mil (*Pennisetum glaucum* R. Leeke cv. Souna 3) cultivés au Sénégal".

1. Objectifs

A travers ce séjour de recherche, on s'est fixé deux objectifs :

- de se familiariser avec les techniques d'étude et l'appareillage utilisés pour suivre les paramètres biophysiques, biochimiques, et moléculaires liés à l'état hydrique interne des plantes ainsi qu'aux réponses développées par ces dernières (échanges gazeux, l'activité photochimique, osmorégulation, activité enzymatique) face à la contrainte ;
- d'acquérir des informations liées à l'acquisition, à la fonctionnalité, et au coût du nouvel équipement du laboratoire partenaire utilisable dans le suivi de nouveaux paramètres en milieu réel.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel et conduite de l'essai

Le matériel végétal étudié est constitué par deux cultivars d'espèces vivrières cultivées au Sénégal : le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Mouride) et le mil (*Pennisetum glaucum* R. Leeke cv. Souna 3)

La culture a été conduite en pots dans une serre automatisée de l'ULB (photopériode : 16/8 ; température jour : 20-25°C/nuit : 15-20°C ; éclairage : 500-600 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; humidité relative : 50-75%). Les pots ont été remplis par un mélange constitué de sable (75,3%), de terreau (1,9%) et de vermiculite (5,6%).

Le semis a été effectué après 48h de ressuyage des pots arrosés à la capacité au champ, à raison de 3 graines traitées au Granox par pot pour le niébé et d'une pincée de grains pour le mil. Un démariage à un pied par pot pour le niébé et à 3 pieds par pot pour le mil, a été réalisé 15 jours après le semis.

Au cours de l'expérimentation, le déficit hydrique a été induit par arrêt de l'arrosage des pots pour les plantes stressées. Les paramètres étudiés ont été suivis pour des niveaux de stress modéré et sévère respectivement sur les mêmes plantes. Leur évolution a été également déterminée pendant la phase de récupération marquée par la reprise de l'arrosage.

Le dispositif expérimental était en randomisation totale. Il comprenait deux facteurs : l'espèce (à 2 niveaux) et le régime hydrique (à 3 niveaux) soient 4 traitements. Chaque traitement a été répété 10 fois soient 40 pots ; l'unité expérimentale étant représentée par un pot,

2.2. Paramètres étudiés et techniques de mesure

Les méthodes et techniques d'étude utilisées sont celles permettant de caractériser l'état hydrique interne des plantes (potentiel hydrique foliaire) et de suivre respectivement les échanges gazeux (conductance stomatique, transpiration, assimilation nette), l'activité photochimique (fluorescence des chlorophylles), les teneurs en pigments chlorophylliens, en proline libre, et l'activité enzymatique (superoxyde dismutase - SOD - et ascorbate peroxydase -- APX -) au cours de la contrainte hydrique.

Les mesures des différents paramètres ont été réalisées sur la 3^{ème} feuille à partir du sommet de la plante, aux mêmes moments correspondant respectivement à des niveaux de stress hydriques modéré et sévère, mais aussi pendant la récupération.

2.2.1. Suivi de l'état hydrique interne

L'évolution du potentiel hydrique foliaire (ψ) a été considérée comme critère d'appréciation de la cinétique de déshydratation (niveau de stress) des plantes soumises à la contrainte hydrique. Le potentiel hydrique foliaire est une grandeur thermodynamique qui caractérise l'état énergétique de l'eau dans la plante. Il correspond à la force (énergie) nécessaire pour extraire l'eau du tissu végétal et la porter à l'état libre.

La presse hydraulique (fabrication locale, LPAV/ULB) et la chambre à pression type PMS 1001 (Corvallis, Oregon, USA) ont été utilisées pour mesurer le potentiel hydrique (ψ) respectivement sur le mil et le niébé. La mesure est destructive et consiste à appliquer une pression contre l'échantillon (feuille entière, bout de feuille) jusqu'à l'apparition du ménisque de sève sur la surface de section dans la chambre à pression -- ou d'une tache humide sur le papier buvard ; cette pression compensant la tension à laquelle la sève était initialement soumise dans la vascularisation du végétal intact. Ce potentiel hydrique défini par rapport celui de l'eau pure libre qui est conventionnellement fixé à zéro (0) sera toujours noté en valeurs négatives.

2.2.2. Suivi des échanges gazeux

Le suivi des échanges gazeux a été réalisé *in vivo* à l'aide de l'analyseur de gaz à infrarouge IRGA (Infrared Gas Analyser) type LCA2-PLC modèle ADC (Analytical Development Co, Ltd., Pindar Road, Hoddesdon, UK). Cet appareil comprend une chambre de mesure, une pompe à air et un microprocesseur. Son principe est basé sur la mesure du taux de photosynthèse par le bilan de CO₂ des flux d'air entrant et sortant de la chambre de mesure.

A partir des paramètres fixés (rayonnement photosynthétiquement actif (PAR), surface foliaire), recueillis au niveau de la chambre d'analyse (débit d'air, humidité relative, pression partielle de CO₂, pression atmosphérique, température), le microprocesseur permet de calculer selon les formules de von Caemmerer et Farquhar (1981) : la photosynthèse nette ($\mu\text{mole CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), la conductance stomatique ($\text{mole CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), la transpiration foliaire ($\text{mole H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), le taux de CO₂ de la chambre sous-stomatique ($\mu\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$ ou $\mu\text{mole CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Les mesures sont effectuées dans une pièce du laboratoire où le rayonnement convenable pour la réalisation des échanges gazeux est fourni par des lampes (400 watts) qui émettent une lumière d'intensité modulable à l'aide d'un filtre.

2.2.3. Suivi de l'activité photochimique

La fluorescence chlorophyllienne s'effectue pendant la phase claire de la photosynthèse au cours des transferts de l'énergie d'excitation entre les molécules de chlorophylle a, et reste étroitement liée à l'activité photosynthétique des plantes. Elle constitue un processus de désactivation des pigments excités qui entre en compétition avec la photochimie et la dissipation thermique.

En effet, en conditions optimales, les quanta de lumière absorbés par les pigments photosynthétiques sont en majorité utilisés par la conversion photochimique (65%), alors qu'une faible partie (3 à 5%) est ré-émise sous forme de fluorescence rouge à proche-infrarouge et de phosphorescence ou dissipée sous forme de chaleur -- non radiative -- (20 à

25%). Il apparaît ainsi que la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique ne s'effectue pas avec un rendement de 100%.

Pai ailleurs, une forte relation existe entre ces différentes voies de désactivation. Lors du ralentissement de l'activité photosynthétique par les stress environnementaux (déficit hydrique, déficience minérale, toxicité, hautes et basses températures, fortes luminosités...), on observe un accroissement des formes de dissipation autres que le transfert d'électrons. C'est ainsi que l'augmentation de l'émission de fluorescence chlorophyllienne permet d'indiquer une perturbation de la dissipation d'énergie par photochimie.

Le signal de fluorescence est d'un intérêt écophysioologique réel par sa facilité de mesure *in vivo* et sa richesse en information sur l'activité photochimique notamment celle du photosystème II qui est le plus sensible aux contraintes environnementales.

2.2.3.1. Principe

Lorsqu'on illumine une feuille préalablement adaptée à l'obscurité, on enregistre une émission de fluorescence qui varie avec le temps d'illumination. Ce phénomène est connu sous le nom d'*effet Kautsky*, et peut être matérialisé sous forme graphique dite courbe d'induction

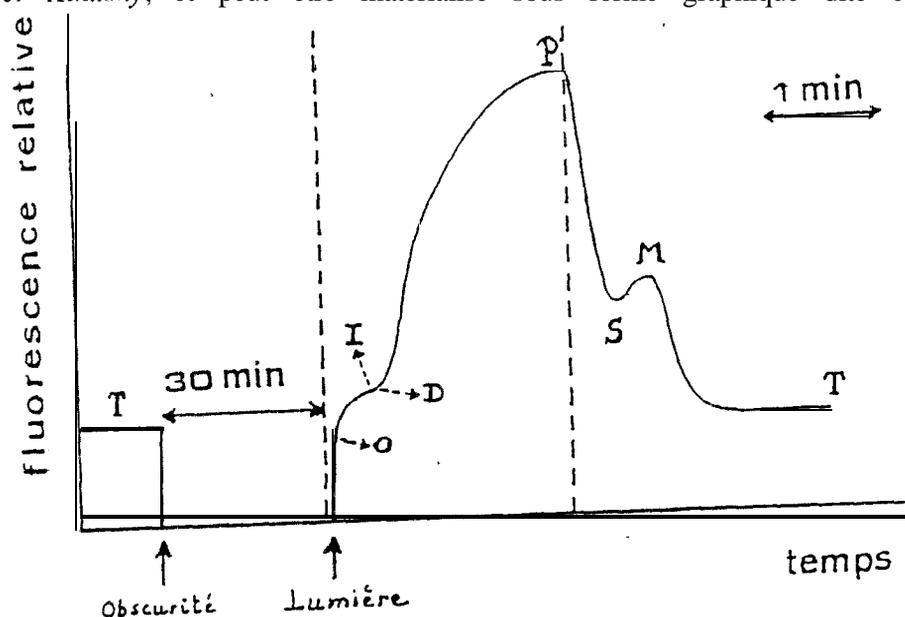


Figure 1 : Représentation schématique de la cinétique de fluorescence chez les végétaux chlorophylliens.

On distingue deux phases :

- une montée très rapide de fluorescence (1 à 2 secondes) ;
- une descente lente (10 à 15 mn) correspondant à une extinction ou *quenching*.

Le lien entre les différentes phases de cette variation de fluorescence et l'activité physiologique des plantes a été établi.

O : correspond à une mesure de la distribution initiale (F_0) de l'énergie d'excitation ainsi que de l'efficacité de la capture d'énergie au niveau du PSII. Tous les centres réactionnels du PSII sont ouverts et les accepteurs d'électrons Q_A sont à leur niveau maximal d'oxydation.

O-I : correspond à une réduction des accepteurs primaires d'électrons Q_A en équilibre avec Q_B et une accumulation de Q_B sous forme PQH_2 .

I-P : traduit une accumulation de Q_A^- et de Q_B^{2-} . La fluorescence est au maximum lorsque le pool de PQ est réduit.

P-T : indique l'extinction de fluorescence dite phase lente. Il y a activation de la capacité de transfert d'électrons au niveau du PSII et activation de la chaîne complète. Cette phase lente aboutira à une stabilisation de l'émission de fluorescence correspondant à l'état stationnaire.

A partir de points remarquables de cette cinétique, on déterminera les paramètres quantitatifs caractéristiques des réactions photochimiques et non photochimiques de la photosynthèse qui permettent de caractériser l'état physiologique de l'appareil photosynthétique.

Au cours de ces travaux, nous avons utilisé les deux principaux appareils permettant actuellement d'étudier la cinétique de la fluorescence : les analyseurs PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech) et PAM (Pulse Amplitude Modulation, Hansatech). Ils autorisent respectivement les mesures de la fluorescence rapide (excitation des chlorophylles), et à la fois de la fluorescence lente et rapide (excitation-désactivation).

2.2.3.2. Description des appareils

- Le Pulse Amplitude Modulation ou PAM

Ce fluorimètre fonctionne avec une lumière modulée et une lumière blanche actinique non modulée. Il comprend une photodiode émettrice rouge pour exciter la fluorescence, et dont les longueurs d'ondes (environ 630 nm) sont absorbées préférentiellement par le PSII. Une photodiode réceptrice munie d'un filtre rouge (environ 700 nm) permet de détecter la lumière de longueur d'onde supérieure à 700 nm et correspondant à la fluorescence ré-émise par la feuille. L'appareil se complète d'un oscilloscope et d'un enregistreur à papier, et ne permet que des observations au laboratoire.

Cette technique de mesure constitue une référence pour les mesures et les études de la fluorescence des végétaux. Elle s'appuie sur les travaux de Schreiber (1983), de Schreiber *et al.* (1986), et de Schreiber et Rilger (1987) à qui revient la conception du prototype du fluorimètre modulé. Elle permet l'analyse des paramètres de la cinétique complète (rapide et lente) de la fluorescence des chlorophylles.

Elle consiste à mesurer la fluorescence des feuilles excitées par une faible lumière analytique pulsée (PI) - suffisamment faible pour ne pas provoquer de variations de l'état fluorescent -- et à mesurer l'accroissement de ce signal analytique lorsqu'on lui superpose une forte lumière saturante (SP). Cet accroissement est ensuite mesuré en présence d'une lumière blanche actinique (AI) non modulée et d'intensité variable servant à induire la cinétique de fluorescence chlorophyllienne (Figure 2). Le terme de cette mesure est marqué par une réduction complète des quinones obtenue en appliquant une lumière rouge-lointain (FR) qui excite préférentiellement le PSI.

Cette courbe présente des points caractéristiques que sont :

- F_0 = intensité de la fluorescence initiale à l'état adapté à l'obscurité et correspondant à la fluorescence des antennes avant tout processus photochimique (tous les centres réactionnels ouverts) ;
- F_M = intensité de la fluorescence maximale à l'état adapté à l'obscurité et correspondant à la réduction maximale du pool de quinones (tous les centres réactionnels fermés) ;
- F'_0 = intensité de la fluorescence initiale lorsque tous les centres réactionnels sont ouverts à n'importe quel état adapté à la lumière ;
- F'_{M1} = intensité de la fluorescence maximale lorsque tous les centres réactionnels sont fermés à l'état adapté à la lumière ;
- F_s = intensité de la fluorescence à l'état stationnaire (*steady state*) qui définit la période durant laquelle l'intensité de la fluorescence ne change pas: alors que les conditions restent constantes ;
- F = intensité réelle de la fluorescence à n'importe quel moment ;
- F_v = intensité de la fluorescence variable maximale ($F_M - F_0$), état où tous les processus non photochimiques sont à leur minimum ;
- F'_v = intensité de la fluorescence variable maximale ($F'_{M1} - F'_0$) à n'importe quel état adapté à la lumière.

Cet appareil permet l'analyse des paramètres de la cinétique rapide de la fluorescence des chlorophylles.

2.2.4. Suivi de l'activité enzymatique

Dans les conditions normales de croissance, les plantes (et autres êtres vivants aérobiques) libèrent des produits toxiques dérivés de l'oxygène. Les agents de stress végétal les plus redoutés et les plus répandus sont les espèces actives de l'oxygène (EAO) qui possèdent une plus ou moins grande réactivité et agressivité vis-à-vis des structures membranaires (lipidiques et protéiques) et/ou nucléaires de la cellule animale ou végétale ; à moins qu'elles soient immédiatement éliminées à leur site de formation (Fridovich, 1974 ; Elstner, 1983 ; Wise et Naylor, 1987 ; Foyer, 1994). Cependant, le stress peut accentuer la libération des EAO par rupture de l'équilibre entre leur production et leur élimination. A terme, les systèmes seront dépassés, ce qui entraîne une destruction irréversible qui met en danger la vie de ces êtres.

Selon Halliwell et Gutteridge (1989), les oxydants dérivés de l'oxygène les plus connus sont les deux formes de l'oxygène singulet que l'on note $^1\Delta gO_2$ et $^1\Sigma g^+O_2$; le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et son acide faible conjugué le radical hydroperoxyl (HO_2^{\cdot}) ; l'eau oxygénée (H_2O_2) et le radical hydroxyl ($\cdot OH$). Toutefois, les organismes ont acquis des systèmes de défense contre ces espèces activées de l'oxygène au cours de leur évolution.

La superoxyde dismutase - SOD - (EC 1.15.1.1) est un enzyme clé qui constitue la première ligne de défense contre la toxicité de l'oxygène et catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et en eau oxygénée (McCord et Fridovich, 1969). En diminuant la concentration à l'état stationnaire du radical superoxyde, la SOD protège la cellule des effets nuisibles de ce radical et des autres espèces réactives de l'oxygène qui en dérivent (Kanematsu et Asada, 1994). La SOD est une métalloenzyme à deux sous-unités de même taille (16000 kDa) liées par un pont bisulfite (Fridovich, 1974). Les trois types connus de cet enzyme se distinguent par leur groupement prosthétique métal pouvant être constitué de manganèse (Mn-SOD), de fer (Fe-SOD) ou de cuivre et de zinc (Cu/Zn-SOD). A partir de leur comportement vis-à-vis de certains inhibiteurs, Rowler *et al.* (1992) distinguent : le type Cu/Zn-SOD sensible au KCN et à H_2O_2 , le type Fe-SOD qui n'est sensible qu'à H_2O_2 , et le type Mn-SOD insensible aux deux inhibiteurs.

La détoxification des radicaux superoxydes par les SODs produit de l'eau oxygénée qui est aussi un poison pour les structures membranaires (Bowler *et al.*, 1992). L'eau oxygénée est éliminée par la catalase et par l'ascorbate peroxydase - APX - (Mittler et Zilinskas, 1994).

L'efficacité de la résistance de la plante aux radicaux superoxydes et à leurs dérivés sera fonction de l'aptitude de la plante à produire en quantité suffisante, et à temps opportun les enzymes de détoxification (SOD, APX, glutathion-réductase, ...) lui permettant de se débarrasser rapidement de ces entités toxiques.

Une connaissance de l'évolution de l'activité et/ou des isoformes de SOD au cours de l'induction du déficit hydrique permettrait de comprendre le niveau d'implication de ces enzymes dans la physiologie de la résistance au déficit hydrique. Il serait également utile de rechercher la relation pouvant exister entre l'activité de ces enzymes et l'efficacité de la photosynthèse en conditions de déficit hydrique.

2.2.4.1. Activité superoxyde dismutase

L'activité enzymatique des isoformes de superoxyde dismutase a été évaluée à partir de gels unidimensionnels non-dénaturants de bis-polyacrylamide (1 : 29) de 16% selon le protocole de Beauchamp et Fridovich (1971) modifié par Mauro *et al.* (non publié) (voir annexe).

L'activité superoxyde dismutase a été déterminée par la technique de coloration négative grâce aux différences de couleur des formes réduites (jaune) et oxydées (mauve) du bleu de tétrazolium (Nitroblue Tetrazolium : NBT). L'identification des isoenzymes a été possible

grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques avec une légère modification : 0,2 M KCN pour Cu/ZnSOD, 0,5 M H₂O₂ pour Cu/ZnSOD et FeSOD.

2.2.4.2. *Activité ascorbate peroxydase (APX)*

Au cours de notre expérimentation, le dosage de l'activité ascorbate peroxydase a été effectué selon le protocole de Mittler et Zilinskas (1994) (voir annexe).

2.2.5 Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes

Des disques foliaires de surfaces connues sont prélevés à l'aide de l'emporte-pièce puis broyés au potter dans 3 ml d'acétone 80%. L'extrait est centrifugé à 10 000 tr/min pendant 1 minute. Le surnageant est prélevé, et la lecture de l'absorbance (A) faite aux longueurs d'onde suivantes : 470 nm, 646 nm, 652 nm, 663 nm et 750 nm.

Les teneurs en chlorophylle a (Chla), chlorophylle b (Chlb), chlorophylles totales (Chla+Chlb) et caroténoïdes (Cx+c) ont été calculées et rapportées à la surface prélevée (mg.m⁻²) selon Lichtenthaler et Wellburn (1983) à partir des formules suivantes :

$$\text{Chla} = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646}$$

$$\text{Chlb} = 20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}$$

$$\text{Cx+c} = (1000 \times A_{470} - 3,27 \times \text{Chla} - 104 \times \text{Chlb}) / 229$$

2.2.6. Dosage de la proline foliaire libre

Pour résister au stress environnementaux, certaines plantes sont capables de maintenir des pressions osmotiques élevées dans leurs cellules. Cette augmentation est due à une accumulation de toute une série de substances osmorégulatrices et osmoprotectrices (polyols, acides aminés...).

h-t-ni tous les amino-acides présents chez les végétaux, la proline est celui dont la synthèse est la plus importante en période de stress (Rarnett et Naylor, 1966). Elle joue un rôle d'osmorégulateur de la turgescence cellulaire (Field, 1976) et d'osmoprotecteur des enzymes cytoplasmiques (Pollard et Wyn Jones, 1979).

Pendant l'extraction, l'échantillon (0,5 g de feuille) a été broyé dans 10 ml d'acide sulfosalicylique 3%, puis filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman n°2. Par la suite, 2 ml de cet extrait filtré ont été prélevés pour le dosage qui a été effectué suivant une technique adaptée de Bates *et al.* (1973) (protocole en annexe).

3. Résultats et discussion

3.1. Paramètres caractéristiques des échanges gazeux

Pendant la période d'induction du déficit hydrique, le suivi des variations des paramètres liés aux échanges gazeux des plantes (conductance stomatique, transpiration foliaire, photosynthèse nette et concentration sous stomatique de CO₂) a été réalisé en fonction du niveau de stress, et les tableaux I et II présentent les résultats obtenus chez les deux espèces.

Tableau 1 : Evolution des paramètres caractéristiques des échanges gazeux chez *Vigna unguiculata* cv. Mouride.

	Phase de déficit hydrique modéré		Phase de déficit hydrique sévère		Phase de reprise de l'arrosage	
	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé
ψ (MPa)	-0,65	-0,85	-0,60	-1,1	-0,65	-0,62
PAR ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	367,7 ± 7,4	420,7 ± 25,3	414,7 ± 26,4	430,3 ± 4,7	396,7 ± 12,1	370,3 ± 40,3
Tf (°C)	30,89 ± 0,2	30,6 ± 0,3	28,1 ± 0,1	28,4 ± 0,3	28,2 ± 0,5	30,5 ± 0,8
Gs ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	0,10	0	0,10	0	0,2	0,10
Tr ($\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	2,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	3,2 ± 0,3	1,8 ± 0,3	4,1 ± 0,5	4,5 ± 0,7

PN ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	2,9 ± 0,7	0	4,7 ± 0,9	1,3 ± 0,3	6 ± 2	4,1 ± 2,1
CO₂ int ($\mu\text{l.l}^{-1}$)	483 ± 39,4	581 ± 19,3	334,7 ± 25,4	379,3 ± 17,5	365 ± 19,1	417,7 ± 24,1

Tableau II : Evolution des paramètres caractéristiques des échanges gazeux chez *Pennisetum glaucum* cv. Souna 3.

	Phase de déficit hydrique modéré		Phase de déficit hydrique sévère		Phase de reprise de l'arrosage	
	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé
ψ (MPa)	-0,48	-0,78	-0,48	-1,77	-0,7	-0,7
PAR ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	471,3 ± 22,5	482 ± 4,6	328,7 ± 22,2	420 ± 4,4	372,3 ± 4	350 ± 42,6
Tf (°C)	29,3 ± 0,3	30,2 ± 0,2	29,8 ± 0,1	29,4 ± 0,2	31 ± 1,1	30,9 ± 0,9
Gs ($\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	0,13	0,08	0,16	0,12	0,17	0,16
Tr ($\text{mmol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	4 ± 0,6	3 ± 0,2	4,9 ± 0,3	4 ± 0,6	5,4 ± 0,8	5,3 ± 0,6
PN ($\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	10,7 ± 1	5,3 ± 0,4	8,1 ± 0,9	0	9,5 ± 0,6	9 ± 1,3
CO₂ int ($\mu\text{l.l}^{-1}$)	337,3 + 6,7	581 + 49,7	361 + 40	625 + 75,5	341,3 ± 40	376 ± 51,1

Le tableau I permet de montrer que *Vigna unguiculata* manifeste une diminution de la conductance stomatique (Gs) qui traduit une fermeture rapide des stomates suite à une légère baisse (stress hydrique modéré) avec Gs qui devient nulle. Cette fermeture des stomates induit une forte réduction de la transpiration (Tr). Toutefois, il apparaît que malgré cette fermeture, Tr ne s'annule pas ; ce qui laisse supposer l'existence d'une transpiration cuticulaire.

Parallèlement à cette fermeture stomatique, on note d'une part, une forte baisse de la photosynthèse nette (Pn) qui peut aboutir à un arrêt du phénomène, et d'autre part, une augmentation de la teneur en CO₂ intercellulaire (CO₂ int). Cette augmentation pourrait d'ailleurs être due à une dénaturation des enzymes responsables de son incorporation pendant la photosynthèse (ex : Rubisco -- niébé - et PEPC -- mil -).

Par ailleurs, il faut souligner qu'après cessation de la contrainte hydrique qui se traduit par une du potentiel hydrique des plantes précédemment stressées, Pn et Gs des plantes précédemment stressées tout en augmentant, restent inférieures (récupération incomplète) à celles des plantes témoins qui ont toujours été bien alimentées en eau : de même que la concentration de CO₂ int qui reste plus élevée chez les plantes qui ont subi le stress. Ce constat permet d'émettre l'hypothèse d'une altération partiel de l'appareil photosynthétique (stomates et membranes).

Chez le mil, le tableau II révèle que sous l'effet du déficit hydrique marqué par une baisse de potentiel hydrique foliaire, Gs et Tr baissent significativement ; même si les stomates ne semblent pas montrer une fermeture complète. Concomitamment, Pn accuse une réduction très marquée mais ne s'annule que pour un stress marqué ($\psi = -1,77$ MPa), et la concentration de CO₂ int augmente rapidement et double quasiment chez les plantes stressées pour un déficit hydrique sévère ($\psi = -1,77$ MPa). En outre., après la reprise de l'arrosage, les plantes montrent une récupération complète avec Gs, Tr, Pn, et CO₂ int qui retrouvent des valeurs similaires à celles des plantes témoins qui ont été toujours bien alimentées.

Globalement, le niébé montre une chute plus rapide (peu après l'arrêt d'arrosage) et relativement plus importante de Gs, Tr et Pn par rapport au mil pour PAR et Tf relativement voisins. D'autre part, on note chez les 2 espèces, une accumulation de CO₂ qui cependant, est plus forte chez le mil (près de 2 fois).

Après la reprise de l'arrosage, le niébé manifeste une meilleure capacité de récupération (récupération plus complète). Cela suggère pour la variété de mil *Souna 3* étudiée, une capacité de mettre en œuvre des mécanismes de protection et/ou de réorganisation des lésions provoquées par la contrainte hydrique.

3.2. Evolution des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne

Pour analyser la réponse au stress développée par chacune de ces 2 espèces, les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne suivis sont notamment : le rendement quantique maximal du PS II adapté à l'obscurité ($F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$), le rendement quantique réel du PS II ($F_v'/F_m' = (F_m' - F_o')/F_m'$), le rendement quantique photosynthétique du transport non-cyclique d'électrons dans le PS II ($\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$), les coefficients d'extinction photochimique ($qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$) et non-photochimique ($qNP = 1 - ((F_m' - F_o')/(F_m' - F_o))$) de la fluorescence, et le pourcentage de P700 oxydé (P700⁺).

- F_v/F_m renseigne sur l'efficacité de la capture de l'énergie d'excitation par les centres réactionnels du PS II ouverts à l'obscurité.
- F_v'/F_m' renseigne sur l'efficacité de la capture de l'énergie d'excitation par les centres réactionnels du PS II ouverts à la lumière.
- $\Delta F/F_m'$ exprime l'efficacité du transport non-cyclique des électrons dans le PS II.
- le coefficient d'extinction photochimique (qP) est lié à l'état rédox du premier accepteur d'électrons (Q_A) du PS II et traduit implicitement l'importance des événements photochimiques dans ce photosystème.
- le coefficient qNP , il traduit l'importance des événements non-photochimiques tels que l'émission de chaleur, l'émission de lumière sous forme de fluorescence ou de phosphorescence et le transfert d'énergie entre les deux photosystèmes par *spillover*.
- Le 'P700⁺' est lié à l'état rédox du photosystème I (PS I) accepteur d'électrons venant du PS II., et y traduit implicitement l'efficacité du transport d'électrons.

3.2.1. Rendements quantiques maximum (F_v/F_m) et réel (F_v'/F_m') de la photochimie du PS II

Les figures 1 et 2 donnent l'évolution du rendement quantique maximum (F_v/F_m) et du rendement quantique réel (F_v'/F_m') en réponse au déficit hydrique. Il apparaît que F_v/F_m est peu affecté (-1 à -4%) même en condition stress sévère ; le même niveau d'inhibition étant obtenu chez les 2 espèces, avec un retour à une situation quasi normale après reprise de l'apport d'eau.

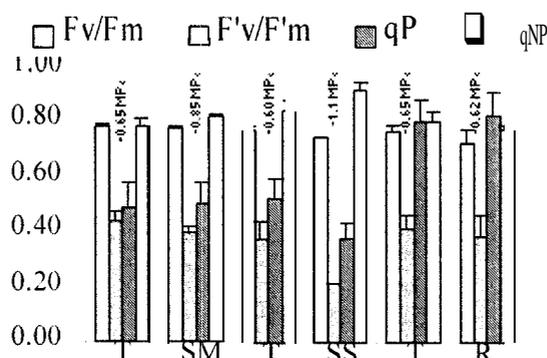


Figure 1 Evolution du rendement quantique maximum (F_v/F_m), du rendement quantique réel (F_v'/F_m'), des coefficients d'extinction photochimique (qP) et non photochimique (qNP) chez *Vigna unguiculata* cv *Mouride* : T = témoin arrosé ; SM = stress modéré ; S = stress sévère ; R = récupération.

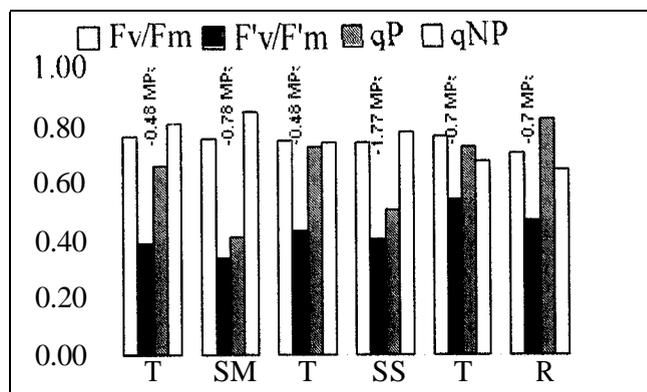


Figure 2 : Evolution du rendement quantique maximum (Fv/Fm), du rendement quantique réel (F'v/F'm), des coefficients d'extinction photochimique (qP) et non photochimique (qNP) chez *Pennisetum glaucum* cv. *Souma 3*.

T : témoin arrosé ; SM = stress modéré ; SS = stress sévère ; R : récupération.

Ce paramètre qui traduit l'efficacité photochimique des feuilles adaptées à l'obscurité ne change pas donc pas significativement pendant le déficit hydrique par rapport au rendement quantique réel de la photochimie du PS II (F'v/F'm). Ce dernier qui caractérise l'efficacité photochimique des centres du PS II ouverts en présence d'une lumière actinique montre chez *Vigna unguiculata* cv. *Mouride*, une inhibition déjà pour un stress modéré (-10%) et fortement accentuée (-43%) à partir -1,1 MPa. Cette inhibition notée au fur et à mesure que le potentiel hydrique baisse a été observée chez *Pennisetum glaucum* cv. *Souma 3*, même si elle est plus faible (7 à 13 %).

Il ressort ainsi qu'au cours du stress, la capacité de capture de l'énergie lumineuse est plus affectée chez *Vigna unguiculata* cv. *Mouride* que chez *Pennisetum glaucum* cv. *Souma 3*, avec une récupération incomplète après la reprise de l'arrosage. Par ailleurs, le maintien d'un rendement quantique maximum de la photochimie du PS II chez les 2 espèces au cours du déficit hydrique pourrait expliquer, en partie, la poursuite de l'assimilation du CO₂, même si c'est avec une plus faible photosynthèse nette.

3.2.2. Coefficients d'extinction photochimique et non-photochimique de la chlorophylle a
Sur les figures 1 et 2, on peut remarquer que le coefficient d'extinction photochimique de la chlorophylle a du PS II (qP), essentiellement fonction de l'état rédox du premier accepteur quonique d'électrons (QA), est inhibé suivant une cinétique semblable (-30%) chez les 2 espèces pour un stress sévère. Cependant, il apparaît que l'inhibition significative de qP semble intervenir plus tôt chez *Pennisetum glaucum* cv. *Souma 3*, puisque, déjà pour un stress modéré, ce paramètre est réduit de 30%. Cette inhibition correspond à une accumulation de la forme réduite de l'accepteur primaire d'électrons (Qh) du PS II qui n'est plus réoxydée au cours du stress.

Quant au coefficient d'extinction non photochimique (qNP), il montre une cinétique d'accroissement (correspondant à une amplification des événements non photochimiques) semblable chez les 2 espèces, et ceci quasiment (5 à 8%), pour les 2 niveaux de contraintes appliquées. Il convient également de souligner que ces 2 paramètres révèlent une tendance à un retour à l'état initial lorsque les conditions hydriques redeviennent favorables, indiqueraient une réoxydation de QA⁻ chez ces plantes.

Ce résultat viendrait confirmer la capacité de reprise de l'activité photosynthétique observée à partir de la photosynthèse nette (Tableau I et II), même si celle-ci semble effective chez *Pennisetum glaucum* cv. *Souma 3*. Cette observation impliquerait ainsi la mise en œuvre de mécanismes de protection et/ou de régulation chez ces plantes.

X2.3. Rendement quantique photosynthétique du transport non-cyclique d'électrons dans le PS II ($\Delta F/F_m'$) et taux de P700 oxydé (P700⁺)

Les figures 3 et 4 présentent l'évolution de $\Delta F/F_m'$ et P700⁺ au cours de l'induction du stress chez *Vigna unguiculata* cv. *Mouride* et *Pennisetum glaucum* cv. *Souna 3* respectivement. Il apparaît que le rendement quantique photosynthétique du transport non-cyclique d'électrons dans le PS II ($\Delta F/F_m'$) qui exprime la probabilité pour qu'un photon absorbé par le centre réactionnel du PS II déplace un électron au-delà du premier accepteur Q_A, n'est significativement affecté (baisse) chez *Vigna unguiculata* cv. *Mouride* que pour un niveau de stress sévère ($\psi = -1,1$ MPa) (Figure 3), mais retrouve celui des témoins après une récupération qui suit la reprise de l'arrosage. Par ailleurs, la figure 4 permet de constater que chez *Pennisetum glaucum* cv. *Souna 3* cette diminution de $\Delta F/F_m'$ se manifeste de manière plus accentuée déjà pour un stress modéré ($\psi = -0,78$ MPa), et se poursuit pour un stress sévère ($\psi = -1,77$ MPa). Cette espèce révèle également une bonne capacité de récupération suite au stress qui se traduit par le retour à un $\Delta F/F_m'$ similaire à celui des plantes bien arrosées.

D'autre part, il ressort de ces figures 3 et 4 que la forme oxydée du P700 s'accumule (accroissement de 10 à 15%) au cours du stress hydrique ($\psi = -0,85$ MPa et $\psi = -1,1$ MPa) chez *Vigna unguiculata* cv. *Mouride*, et traduit une inhibition du transport d'électrons dans le PS I, donc de la réduction du CO₂. Cette inhibition pourrait d'ailleurs être mise en relation avec la chute très marquée de la photosynthèse nette (Tableau I). Pour ce paramètre, cette espèce affiche une bonne capacité de récupération.

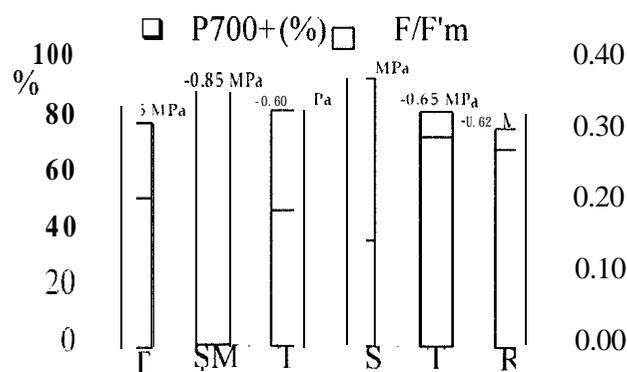


Figure 3 : Evolution du pourcentage de P700⁺ et du rendement quantique photosynthétique du transport non-cyclique d'électrons chez *Vigna unguiculata* cv. *Mouride*.

T = témoin arrosé ; SM = stress modéré ; SS = stress sévère ; R = récupération.

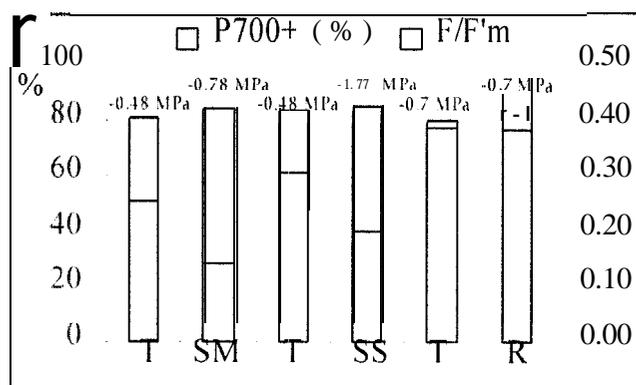


Figure 4 : Evolution du pourcentage de P700⁺ et du rendement quantique photosynthétique du transport non-cyclique d'électrons chez *Pennisetum glaucum* cv. *Souna 3*.

T = témoin arrosé ; SM = stress modéré ; SS = stress sévère ; R = récupération.

Comparativement à *Vigna unguiculata* cv. *Mouride*, la figure 4 montre que chez *Pennisetum glaucum* cv. *Souna 3* ce paramètre reste quasiment insensible au déficit hydrique. Cette particularité pourrait contribuer à expliquer la capacité à maintenir la photosynthèse nette à des niveaux relativement intéressants notée chez cette plante (Tableau II).

Compte tenu de ces résultats sur la cinétique de la photochimie au cours du stress d'une part, et de la nature des centres réactionnels du PS II essentiellement constitués de complexes protéiques d'autre part, l'étude de l'expression des protéines essentielles impliquées dans le fonctionnement de ces centres pourrait certainement aider à mieux appréhender les aptitudes et les mécanismes de défense de ces plantes.

3.3. Evolution des pigments photosynthétiques et de la teneur en proline libre

3.3.1. Teneurs en pigments photosynthétiques

L'évolution de la teneur des pigments photosynthétiques (chlorophylles a et b, et caroténoïdes) a été suivie au cours du stress hydrique et pendant la phase de récupération chez *Vigna unguiculata* cv. *Mouride* et *Pennisetum glaucum* cv. *Souna 3*. Les figures 5 et 6 donnent les résultats obtenus, et révèlent que la teneur des pigments impliqués dans la capture de l'énergie lumineuse diminue en condition de déficit hydrique chez ces 2 espèces.

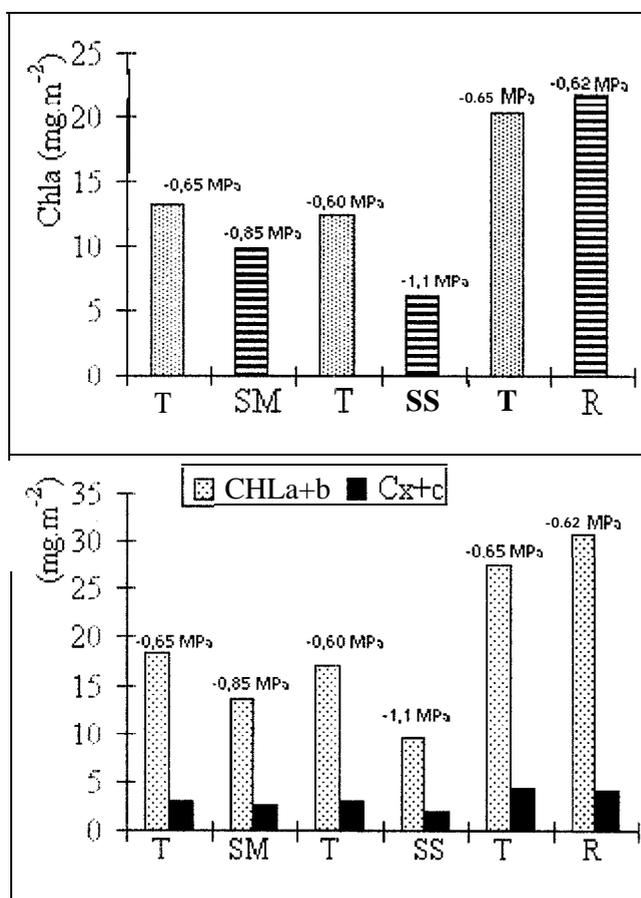


Figure 5 : Evolution de la teneur en pigments chlorophylliens au cours de l'induction du stress et pendant la phase de récupération chez *Vigna unguiculata* cv. *Mouride*.

T = témoin arrosé ; SM = stress modéré ; SS = stress sévère ; R = récupération.

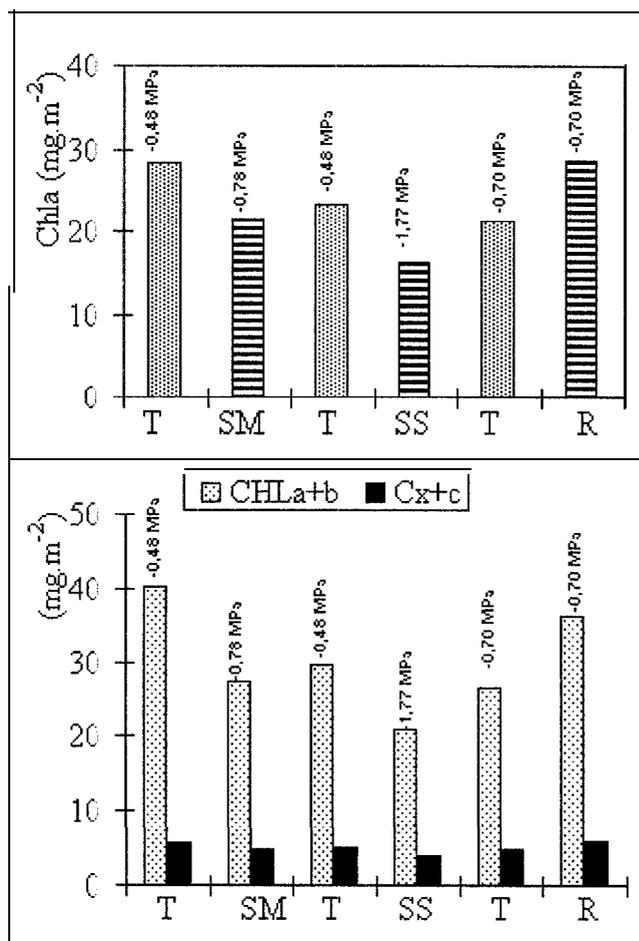


Figure 6 Evolution de la teneur en pigments chlorophylliens au cours de l'induction du stress et pendant la phase de récupération chez *Pennisetum glaucum* cv. *Souana 3*.

T = témoin arrosé ; SM = stress modéré ; SS = stress sévère ; R = récupération.

C'est ainsi qu'on a pu constater une baisse de la teneur en chlorophylle a (Chla) et en chlorophylles totales (Chla+b) induite déjà par un stress modéré (Chla : -26% chez *Vigna* et 24% chez *Pennisetum* ; Chla + b : -25% chez *Vigna* et -32% chez *Pennisetum*), et qui s'accroît pour une intensité plus forte de ce déficit hydrique (Chla : -51% chez *Vigna* et 30% chez *Pennisetum* ; Chla+b : -44% chez *Vigna* et -29% chez *Pennisetum*). Cependant, il convient de noter que cette réduction est toujours plus accentuée chez *Vigna*.

Par ailleurs, il ressort également que les plantes présentent une bonne capacité de récupération, avec des teneurs en Chla et en Chla+b qui retrouvent des valeurs mêmes supérieures à celles des plantes témoins qui ont toujours été bien arrosées (Chla : -7% chez *Vigna* et +35% chez *Pennisetum* ; Chla+b : 12% chez *Vigna* et +37% chez *Pennisetum*).

D'autre part, les caroténoïdes (Cx+c), pigments accessoires qui protègent les chlorophylles contre les excès de chaleur, montrent chez les 2 espèces, une cinétique similaire à celle de Chla et Chla+b : ceci, aussi bien pendant le stress qu'au cours de la reprise (stress modéré : 10% chez *Vigna* et +13% chez *Pennisetum* ; stress sévère : -35% chez *Vigna* et -24% chez *Pennisetum* ; récupération : +2% chez *Vigna* et 23% chez *Pennisetum*). Toutefois, on peut remarquer que ces caroténoïdes sont moins affectés par la contrainte hydrique par rapport aux chlorophylles. Cette tendance à un maintien des teneurs en caroténoïdes semble être confirmée par les ratios Cx+c/Chla+b (Tableaux III et IV) avec une augmentation pendant la phase de stress, et une diminution au cours de la récupération.

Tableau III : Cinétique des rapports Chla/Chlb et Cx+c/Chla+b au cours du stress hydrique et pendant la récupération chez *Vigna unguiculata cv. Mouride*.

	Phase de déficit hydrique modéré		Phase de déficit hydrique sévère		Phase de reprise de l'arrosage	
	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé
ψ (MPa)	-0,65	-0,85	-0,60	-1,1	-0,65	-0,62
Chla/Chlb	2,60	2,57	2,66	1,80	2,90	2,44
Cx+c/Chla+b	0,16	0,20	0,18	0,21	0,16	0,14

Tableau IV : Cinétique des rapports Chla/Chlb et Cx+c/Chla+b au cours du stress hydrique et pendant la récupération chez *Pennisetum glaucum cv. Souna 3*.

	Phase de stress modéré		Phase de stress sévère		Phase de reprise de l'arrosage	
	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé
ψ (MPa)	-0,48	-0,78	-0,48	-1,77	-0,7	-0,7
Chla/Chlb	2,36	3,66	3,70	3,46	4,01	3,66
Cx+c/Chla+b	0,14	0,18	0,17	0,18	0,18	0,16

Les variations de la teneur en chlorophylles totales pourraient fournir une explication des variations de la photosynthèse nette (Pn) et de la concentration en CO₂ intercellulaire observées chez ces 2 espèces (Tableaux I et II). C'est ainsi que la chute plus marquée de la teneur en chlorophylles chez *Vigna* pourrait justifier la baisse très forte de Pn ; une relation linéaire existant entre l'assimilation nette et la teneur en chlorophylles totales. En outre, la décroissance puis l'arrêt de l'assimilation du CO₂ sont, selon certains auteurs, induits par la diminution de la teneur en chlorophylles totales, avec Chla constituant les principales antennes collectrices de l'énergie utilisée par le PS II. Ces résultats pourraient être mis en rapport avec les inhibitions des rendements quantiques de capture de l'énergie d'excitation et de transfert des électrons dans le photosystème II ainsi que les inhibitions des événements photochimiques observées chez les plantes.

Egalement, ces observations font ressortir l'intérêt des techniques fluorimétriques qui ainsi s'adaptent particulièrement au criblage rapide de cultivars des zones sèches. Toutefois, afin d'arriver à une meilleure corrélation entre cette fluorescence et les teneurs en chlorophylles, il serait intéressant d'encourager l'utilisation d'appareils permettant le suivi *in vivo* (en temps réel) de ces teneurs en chlorophylles (ex : Chlorophyll meter SPAD-502, Minolta Camera Co. L. td., Osaka, Japan), à l'image du PEA et du PAM portable pour la fluorescence.

3.3.2. Proline libre foliaire

Les tableaux V et VI présentent les cinétiques de la teneur en proline libre dosée dans les feuilles de *Vigna unguiculata cv. Mouride* et *Pennisetum glaucum cv. Souna 3*. Ils ont permis de mettre en évidence une accumulation progressive de proline au cours du stress et qui est d'autant plus forte que la contrainte hydrique est intense. Par ailleurs, il apparaît que, si cette accumulation est plus précoce chez *Vigna unguiculata cv. Mouride* (Tableau V), elle est plus accentuée chez *Pennisetum glaucum cv. Souna 3* (Tableau VI). Suite à la reprise de l'arrosage, on peut également souligner le retour aux teneurs faibles naturellement présentes chez ces plantes.

Tableau V : Evolution de la teneur en proline libre des feuilles de *Vigna unguiculata* cv, Mouride au cours du stress et pendant la récupération.

	Phase de déficit hydrique modéré		Phase de déficit hydrique sévère		Phase de reprise de l'arrosage	
	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé
Ψ (MPa)	-0,65	-0,85	-0,60	-1,1	-0,65	-0,62
Proline libre ($\mu\text{moles.gMF}^{-1}$)	16×10^{-4}	50×10^{-4}	9×10^{-4}	25×10^{-4}	10×10^{-4}	5×10^{-4}

Tableau Vi : Evolution de la teneur en proline libre des feuilles de *Pennisetum glaucum* cv Souma 3 au cours du stress et pendant la récupération.

	Phase de déficit hydrique modéré		Phase de déficit hydrique sévère		Phase de reprise de l'arrosage	
	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé	Témoin	Stressé
Ψ (MPa)	-0,48	-0,78	-0,48	-1,77	-0,7	-0,7
Proline libre ($\mu\text{moles.gMF}^{-1}$)	10^{-4}	5×10^{-4}	9×10^{-4}	281×10^{-4}	10^{-4}	4×10^{-4}

Ce résultat laisse augurer une plus grande capacité de résistance chez *Pennisetum glaucum* cv. Souma 3 d'autant plus que la proline agirait comme osmorégulateur du potentiel de turgescence des plantes pour son maintien dans une gamme favorisant la poursuite de l'activité photosynthétique en période de stress. Ainsi, cette accumulation de proline apparaît comme un bon indicateur métabolique de la sensibilité au stress hydrique chez ces 3 espèces

3.4. Activité enzymatique

3.4.1. Activité superoxyde dismutase

Au cours de l'induction du déficit hydrique et pendant la phase de reprise, la caractérisation et le suivi de l'évolution des isoformes de superoxyde dismutases (SOD) chez les 2 espèces ont été effectués par le dosage électrophorétique de leur activité. Sur la figure 7, les zones du gel contenant les superoxyde dismutases apparaissent en sombre sur l'électrogramme.

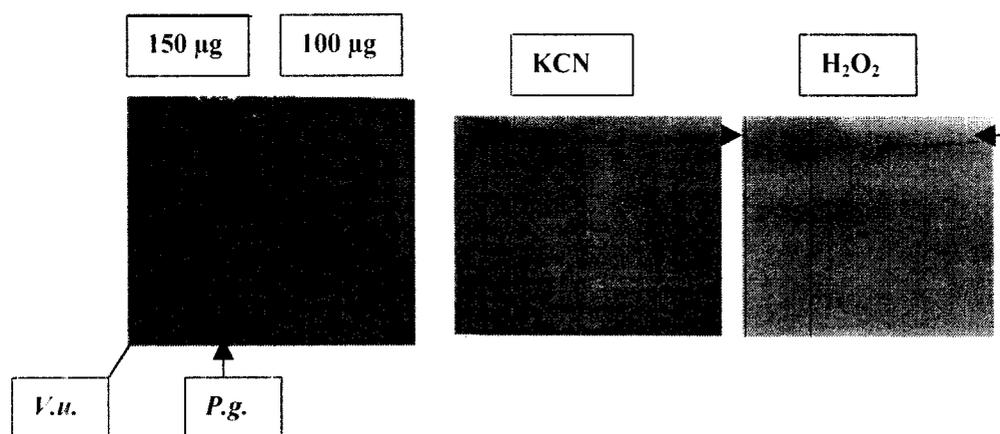


Figure 7 : Mise en évidence des isoformes de superoxyde dismutases chez *Vigna unguiculata* cv Mouride (V.a.) et *Pennisetum glaucum* cv. Souma 3 (P.g.) soumis au déficit hydrique. Les dosages ont été effectués sur des extraits de feuilles de plantes bien arrosées, avec différentes quantités de protéines chargées dans les puits respectifs (100 et 150 µg).

KCN inhibition au cyanure de potassium ; H₂O₂ inhibition à l'eau oxygénée.

A partir de ces profils, il ressort que les trois principales isoformes de superoxyde dismutase connues, que sont la Mn-SOD, la Fe-SOD, et la Cu/Zn-SOD (avec 2 formes) sont présentes chez *Vigna* alors que seules 2 d'entre elles se retrouvent chez *Pennisetum* (Mn-SOD et Cu/Zn-SOD avec 2 formes et une 3^{ème} qui apparaît au cours du stress – Figure 9-). L'emploi d'inhibiteurs spécifiques (KCN pour les Cu/Zn-SOD et H₂O₂ pour Cu/Zn-SOD et Fe-SOD : voir protocole en annexe) a permis de distinguer les différentes formes enzymatiques présentes dans les feuilles de ces 2 espèces (Figure 7).

Les électrogrammes représentés sur les figure 8 et 9 révèlent que l'intensité des bandes SODs varie au cours du déficit hydrique. Il ressort que toutes les isoformes rencontrées chez ces 2 espèces (Mn-SOD, Fe-SOD et Cu/Zn-SOD) augmentent leur concentration en condition de stress, mais que Mn-SOD et Fe-SOD montrent un accroissement plus accentué. Par ailleurs, l'augmentation de cette concentration est plus marquée chez *Pennisetum* que chez *Vigna*.

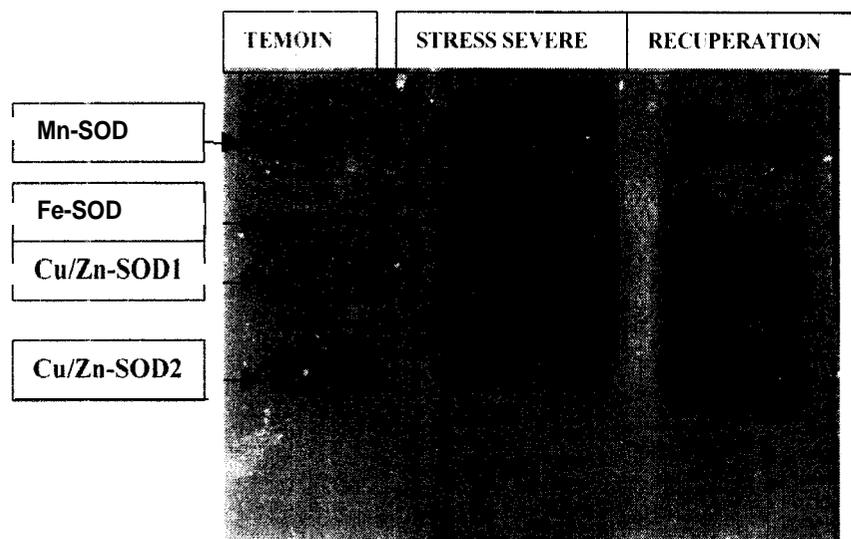


Figure 8 : Profils électrophorétiques de Evolution des isoformes de superoxyde dismutase chez *Vigna unguiculata* cv. *Mouride* soumis au déficit hydrique et après une récupération complète.

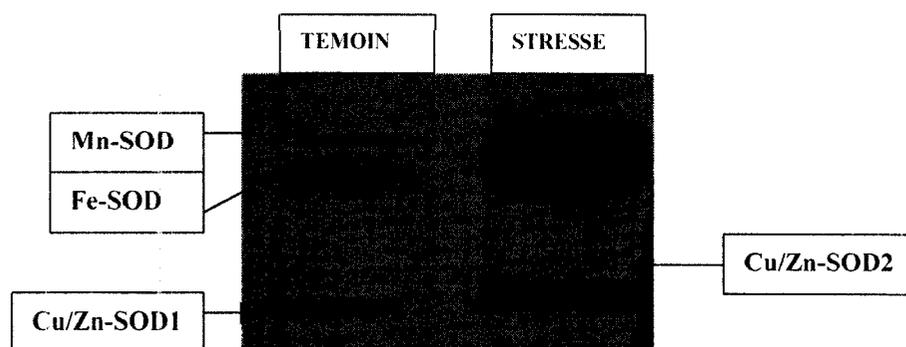


Figure 9 : Profils électrophorétiques de l'évolution des isoformes de superoxyde dismutase chez *Pennisetum glaucum* cv. *Souna 3* soumis au déficit hydrique.

3.42. Activité ascorbate peroxydase

L'inhibition de l'activité Fe-SOD et Cu/Zn-SOD par incubation du gel dans une solution d'eau oxygénée lors de la révélation de l'activité ascorbate peroxydase (APX) a permis la mise en évidence d'une bande majeur-c correspondant à l'APX d'une part, et d'une bande de Mn-SOD d'autre part (Figure 10). D'ailleurs, la concentration de la bande de l'APX apparaît plus forte du fait de l'augmentation de l'activité et de la concentration de cet enzyme avec l'induction du déficit hydrique.

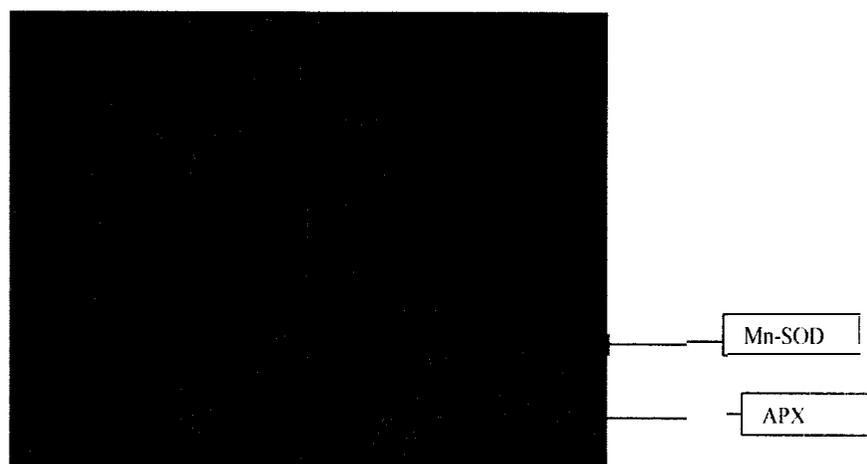


Figure 10 : Profils électrophorétiques de mise en évidence de l'activité APX dans les feuilles de *Vigna unguiculata* cv. *Mouride* au cours d'un stress sévère.

L'évolution de l'intensité des bandes sur les profils électrophorétiques de ces 2 plantes a permis de montrer que la survie aux fortes concentrations en radicaux (stress sévère) dépend de l'accroissement de la concentration en superoxyde dismutases. Cette aptitude des plantes à surexprimer ces isoformes de SOD d'une part, et l'APX d'autre part, constitue un autre mécanisme de résistance face à la contrainte hydrique.

Globalement, il apparaît à partir de ces résultats, que la mise en oeuvre des mécanismes de résistance (fermeture plus ou moins rapide des stomates, augmentation de la teneur en proline libre, maintien de la teneur en pigments protecteurs, accroissement de la concentration en SODs) ne permet qu'une limitation de l'inhibition de l'assimilation de CO_2 . En réalité, ces réactions de défense n'assureraient qu'une atténuation des inhibitions de la capture d'énergie et du transport d'électrons dans les photosystèmes. Cela s'explique par le fait que la résistance au déficit hydrique est un caractère génétique quantitatif impliquant plusieurs gènes complexes difficiles à manipuler (Behlascen *et al.*, 1994 cité par ULB (1998)).

Par ailleurs, les résultats obtenus laissent supposer que les processus photochimiques (capture d'énergie et transport d'électrons) sont plus résistants à la contrainte hydrique que ne le sont les échanges gazeux (surtout pertes d'eau et fixation de CO_2).

Conclusion

Le suivi des échanges gazeux, des activités photochimique et enzymatique, et de paramètres biochimiques liés à la teneur en chlorophylle et en proline ont permis de diagnostiquer l'état (cibles affectées) et la réponse (mécanismes de protection) des plantes au cours de l'induction du stress d'une part, et pendant la phase de récupération d'autre part. Grâce à la sensibilité des techniques utilisées, les variations souvent petites du comportement physiologique et énergétique des plantes ont pu être détectées, et parfois, de manière plus ou moins précoce. En outre, il faut noter les potentialités discriminantes et la complémentarité de ces techniques dans les différentes situations étudiées : techniques pouvant ainsi être valablement utilisées pour le criblage variétal. Les résultats obtenus encouragent la poursuite de recherches sur les aspects biochimiques et moléculaires en vue d'une caractérisation plus complète des cibles affectées et des mécanismes de défense développés par les cultures.

Ce travail réalisé au I.P.A.V. de l'ULB vient s'ajouter à d'autres initiatives (DESS de M^{lle} Ndèye Nd. Diop, Université de Paris 7), et permettra au CERAAS d'aborder les problèmes de sélection et d'amélioration variétale de façon plus moderne et surtout plus efficace. Par ailleurs, par sa vocation régionale, ce Centre pourra assurer le transfert de ces méthodes et techniques nouvelles dont il est dépositaire, aux autres chercheurs africains.

D'un point de vue stratégique, cette démarche permettra à terme, d'affiner et d'uniformiser les méthodes d'études de l'adaptation végétale et de l'amélioration génétique utilisées. D'ailleurs, c'est dans cette perspective que d'autres séjours d'échanges pot-tant sur tes techniques de dosage de l'acide abscissique (ABA) et d'autres indicateurs de stress ainsi que d'autres techniques de biologie moléculaires, sont envisagés avec tes partenaires du Nord (ULB, Université de Paris 7)

Références

- Bates L.S., 1973.- Rapid determination of free protine for water-stress studies. *Plant and Soil* 39, 205-207.
- Beauchamp C., Fridovich I., 1971.- *Analytical Biochemistry* 44, 276-287.
- Bethassen E., This D., Monneveux P., 1994.- *Cahiers Agriculteurs*, 4 : 25 1-261
- Bowler C., Van Montagu M., Inzé D., 1992.- Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 43 : 83-116. : *Annual Reviews of Plant Physiology* 33 : 73-96.
- Foyer C.H., 1994.- La résistance des plantes à l'oxygène. *Lu Recherche* 252 (24) : 269-276
- Fridovich I., 1974.- In : *Molecular mechanisms of oxygen activation*. HAYAISHI, O. (eds), Chap. 11, Academic Press, New York, USA, 678 pp.
- Halliwell B., & Gutteridge J.M.C., 1989.- In : *Free radicals in biology and medicine*. 2nd edition- Clarendon, Oxford. ISBN 0-19-855294-7.
- Kanematsu S., Asada K., 1994.- IN : *Molecular Aspects of Enzyme Catalysis*, (FUKUI, T & SODA, K eds), Kodansha, TOKYO, Chapter 10, pp 19 1-2 10.
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A. R., 1983.- Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc Trans.* 603, 591-592.
- McCord J.M., Fridovich f., 1969.- *Journal of Biochemical Chemistry* 244 : 6049.
- Mittler R., Zitinkas B.A., 1994.- *The Plant Journal* 5 (3) : 397-405.
- Schreiber U., 1983.- Technical review. Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology I. The measuring system. *Photosynthesis Research* 4. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk, The Hague, 361-373.
- Schreiber U., Hitger W., 1986.- Rapid assessment of stress effect on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. NATO workshop, Sesimbra, Portugal, oct. 1985.
- Schreiber U., Schiwa U., Bilger W., 1986.- Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10, 5 1-62.
- ULB, 1998.- Rapport d'activité Contrat TS3-CT930215.
- von Caemmerer, S. and Farquhar, G.D. 1981.- Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376-387.
- Wise R.R., Naylor A.W., 1987.- *Plant Physiology* 83 : 272-277.

ANNEXES

Annexe 1

Protocole de dosage de la proline foliaire libre : Méthode colorimétrique(adapté de Bates *et al.* (1973))**Réactif**

Préparer une solution acide de ninhydrine en ajoutant 1.25 g de ninhydrine dans 30 ml d'acide acétique glacial et 20 ml d'acide phosphorique 6M. Agiter jusqu'à la dissolution totale. Cette solution reste stable pendant 24 heures lorsqu'elle est conservée à froid (4°C).

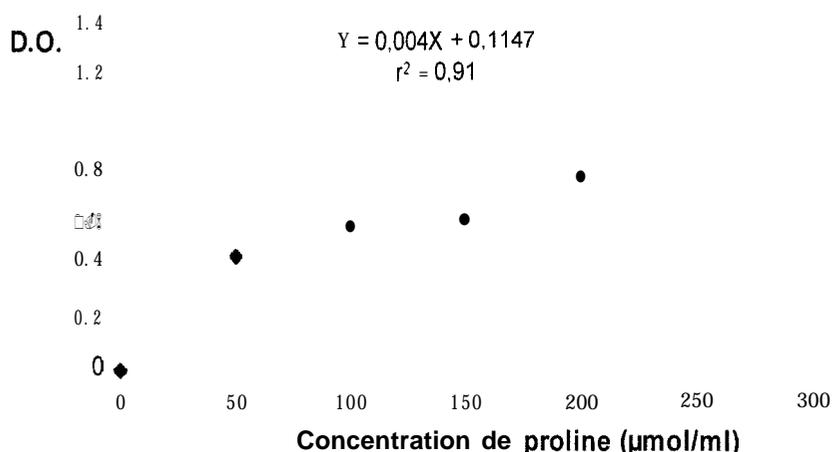
Procédure

- 1- Broyer 0.5 g de matériel végétal (feuille ou racine) dans 10 ml d'acide sulfosalicylique 3%. puis filtrer à l'aide d'un papier filtre Whatman n°2.
- 2- **Ajouter** 2 ml du filtrat à un mélange de 2 ml de la solution acide de ninhydrine et 2 ml d'acide acétique froid dans un tube à essai.
- 3- Porter ce mélange à ébullition (100°C) pendant 1 heure. puis terminer la réaction en plongeant le tube dans un bain glacé.
- 4- Extraire le complexe coloré avec 4 ml de toluène en agitant vigoureusement pendant 15 à 20 secondes.
- 5- Prélever le chromophore contenu dans la phase toluène et le mettre à la température du laboratoire dans des tubes de spectrophotomètre.
- 6- Déterminer l'absorbance à 520 nm en utilisant le toluène comme blanc.
- 7- Déterminer la concentration de proline à partir de la droite d'étalonnage établie auparavant (Figure suivante) avec des concentrations connues de proline commerciale purifiée (gamme étalon : 0-20 µg/ml). La concentration est obtenue en µmole/ml. Pour la ramener en µmole/g de matière fraîche, on multiplie par 5/xg de MF ou on la calcule suivant la formule :

$\mu\text{moles proline/g de matière fraîche} = [(\mu\text{g proline/ml} \times \text{ml toluène}) / 115.5 \mu\text{g } \mu\text{mole}] / [\text{g échantillon}/5]$

N.B. : Cette méthode permet de déterminer des concentrations de proline foliaire libre de 0.1 à 36 µmoles/g de matière fraîche. La manipulation dure environ 2 à 2 h 30 min par lot de 20 échantillons.

Précaution : Vapeur de toluène dangereuse (à ne pas inhaler). Travailler sous une hotte et/ou se munir d'un masque.



t Droite d'étalonnage établie à partir d'une gamme de concentrations de proline purifiée.

Annexe 2

Protocole de mise en évidence des isoformes de superoxyde dismutases végétales par électrophorèse sur gel d'acrylamide

La technique de séparation des formes connues de superoxyde dismutases (SOD) est réalisée en conditions non dénaturantes, et utilise la charge électrique des protéines. La migration de chacune de ces protéines se fait vers l'anode ou la cathode en fonction du signe et de l'intensité de sa charge, de ses dimensions et de la viscosité du milieu de migration.

Cette migration s'effectue dans une matrice obtenue par polymérisation d'acrylamide ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CO-NH}_2$) en présence d'un agent de réticulation, le méthylènebisacrylamide ($((\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CO-NH}_2)_2\text{CH}_2)$ (bis). Cette réaction est induite par le tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et est catalysée par le persulfate d'ammonium (APS).

Les dimensions des mailles du gel seront déterminées par la concentration en acrylamide et le rapport acrylamide/méthylènebisacrylamide. Ces 2 caractéristiques imposent une force qui impose la migration des protéines et facilitent la séparation des constituants des mélanges.

L'activité superoxyde dismutase a été révélée par une technique de coloration négative grâce à la différence de coloration des formes réduites (jaune) et oxydées (mauve) du bleu de tétrazolium (Nitroblue Tetrazolium ou NBT). L'oxydation du NBT intervient suite à l'action des radicaux superoxydes produits par l'illumination de la riboflavine. C'est ainsi que les zones du gel contenant les SOD apparaîtront en clair sur un fond sombre.

L'identification des isoenzymes a été possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (Bowler et al., 1992) avec une légère modification : 4 mM KCN pour Cu/ZnSOD, 10 mM 11202 pour Cu/ZnSOD et FeSOD.

1. Préparation des échantillons

Après prélèvement du matériel végétal (feuilles), un extrait brut de protéines solubles est préparé comme suit :

- broyer 1 gramme de feuille dans 1 ml de tampon d'extraction (voir 2. Composition des solutions utilisées) ;
- centrifuger à 20 000 g pendant 30 mn ou à 15 000 g pendant 45 mn ;
- transférer le surnageant dans un tube à réaction ;
- doser la teneur en protéines (selon la technique Biorad Dye-binding Protein Assay donnée dans le kit de dosage des protéines avec l'albumine sérique de bovin (BSA) comme protéine standard) ;
- déterminer le volume (μl) d'extrait correspondant à 75, 100 ou 150 μg de protéines .

conserver l'extrait au froid.

NB : Pour minimiser les risques de pertes d'activité des enzymes, les précautions suivantes peuvent être prises :

- refroidissement du matériel utilisé ;
- addition de substances réductrices (acide ascorbique, DTT) dans le milieu d'extraction ;
- addition de protéines leurre (BSA).

2. Préparation du gel non dénaturant

Ci-après, nous donnons les proportions des différents produits utilisés dans la préparation des gels de différentes concentrations. Ces quantités sont prévues pour 2 mini-gels de 0.75 mm d'épaisseur, et doivent être considérées à moitié (sauf APS et TEMED) pour un mini-gel. Pour la détection des SOD, un gel de 16% est recommandé.

On distinguera essentiellement le *separating gel* (gel de séparation) et le *stacking gel* permettant la formation des puits.

	10%	12%	14%	16%	18%
Acryl/Bis (29/1) 30%	3,3 ml	4 ml	4,6 ml	5,3 ml	6 ml
Tris-HCl 1 M pH 8,8	3,7 ml	3,7 ml	3,7 ml	3,7 ml	1,2 ml Tris 3 M
Glycérol (100%)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
H2O	2 ml	1,3 ml	0,7 ml	-	1,8 ml
APS	50 µl	50 µl	50 µl	30 µl (40)	30 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl (10)	5 µl

	Mini-gel	Grand gel
Acryl/Bis (29/1) 30%	0,65 ml	1,95 ml
Tris-HCl 1 M pH 8,8	0,65 ml	1,95 ml
Glycérol (100%)	0,5 ml	1,5 ml
H2O	2,9 ml	8,7 ml
APS	40 µl	100 µl
TEMED	10 µl	20 µl

3. Polymérisation du gel, chargement de l'extrait et migration

Après la préparation, ce mélange est coulé dans la cellule, et mis à polymériser au froid pendant 30 à 30 mn. Lorsque la polymérisation est réalisée, ajouter le mélange du *stacking gel* et placer le peigne. L'ensemble est conservé au froid pendant 20 à 30 mn.

Le peigne est ensuite retiré et le chargement de l'extrait (75, 100 ou 150 µg de protéines) est effectué au froid dans les créneaux laissés par ce dernier. La migration est réalisée au froid et sous une tension constant de 200 V.

4. Révélation de l'activité SOD

- Rincer le gel à l'eau distillée.
- Incuber le gel dans ta solution de coloration pendant 20 mn. Cette incubation se fait à l'obscurité et sous agitation douce.
- Exposer le gel à la lumière (table lumineuse) jusqu'à l'apparition de la coloration mauve.
- Fixer le gel dans une solution d'acide acétique 6% (7,5%).

Les tests d'inhibition nécessitent une incubation de 20 mn dans les solutions appropriées, avant la phase d'imprégnation. C'est ainsi que pour inhiber les isoformes Cu/Zn-SOD, on utilisera une solution contenant du KCN, alors que pour inhiber à la fois les Fe-SOD et les Cu/Zn-SOD, on fera usage d'une solution renfermant de l'eau oxygénée (H₂O₂). Dans les 2 cas, l'inhibition dure 20 mn.

Ces gels seront ensuite séchés puis scannés.

5. Composition des solutions utilisées

5.1. Tampon d'extraction

- 50 mM tampon phosphate pH 7.8
- 0.1% (poids/volume) d'albumine sérique de boeuf (BSA)
- 0.1% (poids/volume) d'acide L-ascorbique
- 10 mM dithiothreitol (DTT)

5.2. Gel d'acrylamide (2 mini-gels)

4 ml d'acrylamide 30%

1.5 ml de bis 2%

3.7 ml de 1 M Tris HCl pH 8.7

15 µl de TEMED

33 µl de persulfate d'ammonium (APS) 10%

5.3. Tampon d'électrode (10x) ou tampon de migration

60 g/l de Tris

149 g/l de glycine

Si ce tampon paraît trop dense. préparer un tampon (1 x) avec 6 g de Tris et 14,9 g de glycine dans 1 l d'eau distillée.

5.4. Solution de coloration

20 mg de NBT (ou 2 comprimés dans 100 ml)

37.2 mg de EDTA

20 µl de TEMED

1.5 mg de riboflavine

100 ml de tampon phosphate

5.5. Solution d'inhibition

• Pour les Cu/Zn-SOD

50 mM tampon phosphate pH 7,8

1 mM EDTA

2 mM KCN (ou 0,2 M)

• Pour les Fe-SOD et les Cu/Zn-SOD

50 mM tampon phosphate pH 7,8

1 mM EDTA

5 mM H₂O₂ 30% (ou 0.5 M)

Annexe 3

Protocole de détection de l'activité de l'ascorbate peroxydase

L'ascorbate peroxydase existe sous trois formes principales (thylacoïdes, stroma, cytoplasme) qui catalysent la réaction d'élimination de l'eau oxygénée dans les tissus vivants



1. Extraction des protéines solubles

- Broyer 5 à 10 g de feuilles congelées (à l'aide d'un mortier) dans 10 à 15 ml de tampon (100 mM NaP ou KP pH 7.8 ; 5 mM Ascorbate ; 1 mM EDTA et glycérol 10%)
- Filtrer l'homogénat
- Eliminer les membranes et autres débris par centrifugation à 40 000 g pendant 24 mn.
- Collecter le surnageant et le conserver à -80°C.

2. Electrophorèse

- Préparer un gel de 12% ou 14% d'acrylamide.
- Ajouter de l'ascorbate à 2 mM (préparé à partir du tampon phosphate) dans le tampon d'électrode (voir protocole SOD).
- Effectuer un pré-running de 30 mn pour assurer la pénétration de l'ascorbate dans le gel.
- Faire migrer pendant 1h 45mn ou plus : ce temps ne pouvant jamais dépasser 6 heures,

3. Détection de l'activité enzymatique dans le gel

- Equilibrer le gel dans 50 mM de NaP ou KP pH 7,8 contenant 2 mM Ascorbate pendant 30 mn. en renouvelant le tampon toutes les 10 mn.
- Incuber le gel dans 50 mM de NaP ou KP pH 7,8 contenant 4 mM Ascorbate et 2 mM H₂O₂ pendant 20 mn (*H₂O₂ est ajoutée juste avant l'incubation*).
- Laver le gel dans 50 mM de NaP ou KP pH 7.8 pendant 1 mn.
- Incuber le gel dans la solution de coloration (NaP ou KP pH 7.8 : 28 mM IEMED et 2,45 mM NBT pendant 15 mn.

A la lumière, les bandes correspondant aux ascorbate peroxydases apparaissent après 3 à 5 mn d'incubation. Arrêter alors la coloration par un lavage du gel avec de l'eau distillée.

4. Inhibition

- Equilibrer le gel dans 50 mM de NaP ou KP pH 7.8 pendant 30 mn.
- Incuber le gel dans 50 mM de NaP ou KP pH 7.8 + 4 mM H₂O₂ pendant + 20 mM 4-Chloro-1-Naphtol ou Pyrogallol.
- Laver le gel avec de l'eau distillée puis le scanner immédiatement pour empêcher la disparition des bandes.