

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

\*\*\*\*\*

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie et Ecologie Végétale



N° d'ordre: 09/D3C/2016  
Série: 01/ECO/2016

Thèse Présentée en Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat  
3ème cycle  
Option « Biotechnologie et Génomique Végétales »

Thème

**Caractérisation des gènes de tolérance à la  
sécheresse chez le blé dur : étude du rôle des  
déhydrines et des aquaporines.**

Présentée par M<sup>elle</sup>. Chourouk Hamla

Soutenu le 25 février 2016  
Devant le jury

Président :

Pr. Abdelhamid. Djekoun Professeur Université des Frères Mentouri Constantine

Rapporteur :

Pr. Nadia. Ykhlef Professeur Université des Frères Mentouri Constantine

Examineurs :

Pr. Messaoud. Boudjeniba Professeur Ecole Nationale Supérieure ENS Alger

Dr. Abdelkader. Benbelkacem Directeur de recherche INRA Constantine

Dr. Faïçal. Brini Directeur de recherche Centre de Biotechnologie Sfax Tunisie

Pr. Mohamed. Abdelhafid. Hamidechi Professeur Université des Frères Mentouri Constantine

*Année Universitaire: 2016/2017*

”اللهمَّ لك الحمد حتى ترضى، ولك الحمد إذا رضيت، ولك الحمد بعد الرضا، لك الحمد عدد الكائنات، وملء الأرض والسموات“.

*‘La science est un jeu dont la règle du jeu consiste à trouver quelle est la règle du jeu’.*

*François Cavanna*

*‘Even a drop in the ocean may change the weather’.*

## Remerciements

*Parce qu'ensemble on va plus loin et que toute aide aussi infime, soit-elle, peut faire toute la différence, mes remerciements s'adressent à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse, qu'elles trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude.*

*Je remercie tout d'abord le Pr. N. Ykhlef, pour avoir consenti à suivre ce travail tout au long de sa réalisation avec beaucoup d'attention jusqu'à son aboutissement. Pour les nombreux conseils dont elle m'a fait profiter, pour la grande autonomie dont j'ai bénéficié et pour avoir veillé jusqu'au bout que je puisse parvenir à la concrétisation de cette thèse.*

*Je tiens également à remercier, le Pr. A.Djekoun, recteur de l'Université des frères Mentouri Constantine, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, mais aussi l'ensemble des membres du jury : Pr. M. Boudjeniba, Dr. A. Benbelkacem, Dr. F. Brini et Pr. M.A. Hamidechi, pour avoir eu l'obligeance et l'amabilité d'évaluer ce travail.*

*Je remercie vivement l'ensemble de l'équipe du Laboratoire de Protection et Amélioration des Plantes (LPAP) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie, à leur tête le Pr. K. Masmoudi, anciennement directeur du laboratoire et actuellement directeur du Centre International de l'Agriculture Bio-saline (ICABA), Dubai et le Dr. F. Brini l'actuel directeur du laboratoire (LPAP). Mais aussi, M<sup>me</sup> Ayadi ainsi que tous les doctorants, doctorantes et étudiantes master: Nabil, Walid, Sana, Ikram, Mouna, Siwar, Nibras et Karama. Pour leur chaleureux accueil, leurs aides, leurs conseils et leur soutien. J'espère que vous trouverez ici l'expression de ma profonde gratitude et de ma reconnaissance en vers vous.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également aux membres du laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV), personnels, enseignants et doctorants, notamment l'équipe II Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP) : M<sup>r</sup> Kellou, M<sup>me</sup> Bousbaa, M<sup>me</sup> Maougual, M<sup>elle</sup> Kechid, M<sup>r</sup> Belbekri, M<sup>elle</sup> Djeghar et en particulier M<sup>me</sup> Tourki et M<sup>me</sup> Bouldjej Ryma, pour leur attention à mon égard, leur sympathie et leur gentillesse. Mais surtout à mes collègues 'doctorants': Zoheira, Adra, Karima, Mouna, Nariman, Soumeia, Mina, Meriem, Wassila, Mahmoud et Seif pour tous les bons moments, les fous rires et les difficultés partagées, pour leur présence et leurs aides. Je souhaite à tous ceux qui n'ont pas encore soutenu de concrétiser leur*

*travail avec succès. Sans oublier ma stagiaire Ibtissem, pour sa gentillesse et sa belle présence et je lui souhaite une vie professionnelle très fructueuse.*

*Je tiens aussi à remercier tous mes amis et camarades de promotion en particulier: Lifa Maroua, Zitouni Hind et Guasmi Meriem.*



## *Dédicace*

*Je dédie cet humble travail à la prunelle de mes yeux, mes parents. Maman, tu es une femme comme on en fait peu, tu es ma force et mon refuge. Papa, tu es mon héros et mon pilier;*

*À mes grands-parents maternels adorés, pour tout l'amour et l'affection dont vous m'avez toujours entouré;*

*À la mémoire de mes très chers grands-parents paternels, je sais que vous auriez été fiers de moi;*

*À mon petit frère, mais pas si petit que ça, t'avoir à mes côtés, m'est très précieux;*

*À mes tantines et mes tontons chéris, vous qui avez toujours été là pour moi, sans oublier tata Salima, paix à son âme;*

*À mes cousins(es) les petits bouts de choux et les plus grands;*

*À mes sœurs de sang, Nes, Zouzouwa et Btis, pour avoir sans cesse cru en moi envers et contre tout;*

*À tonton Rachid, tata Warda et Sirine, pour leur soutien et leurs encouragements;*

*À tous mes proches et ami(e)s, même si je ne puis vous citer un à un, je ne vous oublie pas;*

*À mes deux familles, Yaïche et Hamla.*

## Résumé

La compréhension des mécanismes moléculaires de tolérance à la sécheresse chez les céréales et notamment chez le blé, demeure primordiale afin de pallier aux effets néfastes du stress. Les stratégies adaptatives mises en place induisent des modifications dans les programmes transcriptionnels d'un assortiment de gènes. La présente étude s'est fixée comme objectif, de réaliser une étude comparative du comportement de quelques variétés de blé dur, en réponse à un stress hydrique au niveau physiologique, biochimique et au niveau moléculaire, en se focalisant sur le profil d'expression de deux gènes de réponse au stress. Trois expérimentations ont été réalisées sur des variétés de blé dur Algériennes. Deux d'entre elles en conditions contrôlées en chambre de culture et une en conditions semi-contrôlées sous serre. En conditions contrôlées, le stress hydrique a été imposé par addition de polyéthylène glycol et sous serre par arrêt d'irrigation. Au niveau physiologique et biochimique la caractérisation de la réponse des génotypes a été effectuée en s'appuyant sur divers indices: la capacité de germination, le nombre de racines, les longueurs foliaires et racinaires, le ratio LR /LF, la matière sèche, la teneur relative en eau, la température foliaire, le taux de chlorophylle, la conductance stomatique, le taux d'électrolytes, la teneur en sucres etc. Une électrophorèse en 1D SDS-PAGE des protéines thermostables a également été réalisée. Les études conduites ont fait ressortir des différences significatives entre variétés et entre traitements hydriques pour la plupart des caractères étudiés, exception faite pour : les longueurs foliaires, les longueurs racinaires et la température foliaire (en présence de polyéthylène glycol). Le stress hydrique a induit une diminution de la capacité de germination, du nombre de racines, de la quantité des feuilles en chlorophylle et de la conductance stomatique ayant pour conséquence une diminution de la production en matière sèche. Mais aussi une diminution de la teneur relative en eau, accompagnée d'une augmentation du taux d'électrolytes et des sucres solubles. Les différences observées concernant les bandes protéiques révélées par 1D SDS-PAGE, se traduisent en terme de poids moléculaire et d'intensité. Une analyse du niveau d'expression d'un gène déhydrine (DHN-5) et d'un gène aquaporine (TdPIP2,1) a été réalisée sous différentes conditions de stress hydrique et sur différents tissus chez deux variétés (Waha et Beliouni). L'expression du gène DHN-5 n'a pas été induite chez les plantes contrôles mais uniquement chez les plantes stressées au niveau des racines, des feuilles et des gaines. Tandis que, l'expression du gène TdPIP2,1 a été observée pour les deux lots de plantes mais dans une plus grande mesure chez les plantes stressées au niveau des racines, des feuilles et des gaines. De plus, les niveaux de transcrits des gènes étudiés ont été plus marqués chez Beliouni. Une surexpression de ces gènes semble améliorer la tolérance au déficit hydrique et entraîner des réponses cellulaires appropriées, afin de pallier au dommage causé par le déficit hydrique à travers divers mécanismes. Il existe une connexion solide entre les modifications qui se produisent au niveau physiologique et cellulaire et celles qui se produisent au niveau moléculaire. La mise en évidence, d'une relation entre les gènes de réponse au stress simultanément exprimés, fournit des données d'une grande importance à la mise en œuvre d'approches biotechnologiques plus élaborées.

**Mots clés:** Blé dur, stress hydrique, PEG, germination, traits physiologiques, protéines thermostables, déhydrine, aquaporine, expression génique.

## Abstract

The knowledge of molecular tolerance mechanisms to drought in cereals and particularly in wheat remain essential in order to cope with the stress negative effects. Plant response rely on the expression of several genes, the outcome is a modification in their transcriptional programs. The main objective of the present study was to perform a comparative analysis of durum wheat genotype response to drought at physiological, biochemical and molecular level by focusing on two stress responsive genes. Three experimentations have been done on Algerian durum wheat genotypes, two of them under controlled conditions in growth chamber and the third one under semi controlled conditions in a green house. Under controlled conditions, the water stress was applied by adding polyethylene glycol to the media and under semi controlled conditions, it was applied by withholding water. At physiological and the biochemical level, the characterization of the genotypes response to water stress was analyzed through several indices such as: germination rate, leaf and root length, root number, LR/LF ratio, dry matter, relative water content, leaf temperature, chlorophyll content (SPAD index), stomatal conductance, electrolyte leakage, sugar accumulation. Also a 1D SDS-PAGE electrophoresis of heat stable proteins was performed. The conducted studies highlighted significant differences between varieties and drought treatments for most of the studied traits, except for: leaf and root length and leaf temperature (under polyethylene glycol induced drought stress). Water stress induced a decrease in germination rate, root number, chlorophyll content and stomatal conductance that result in a decrease in dry matter production. Also a decrease in relative water content, combined with an increase in electrolyte leakage and sugar content. The observed differences regarding protein bands revealed by 1D SDS-PAGE electrophoresis affected as well their intensity and their molecular weight. Expression level of an aquaporin gene (TdPIP2,1) and a dehydrin gene (DHN-5) were also investigated in different plant tissues and under different drought stress conditions for two varieties (Waha and Beliouni). The dehydrin gene (DHN-5) was not expressed in well watered plants but only in the stressed ones in roots, leaves and blades. While the aquaporin gene (TdPIP2,1) was expressed in both, with a higher amount in stressed plants in roots, leaves and blades. Moreover, the transcript level of the two genes was more accumulated in Beliouni. The upper expression of these genes may improve water deficit tolerance and lead to suitable cellular response in order to cope with drought stress damages through several mechanisms. There is a strong connection between the modifications that occurs on the molecular, cellular level and those that occurs on physiological level. The identification of a possible connection between activated stress responsive genes can be useful by providing a starting point to further elaborate biotechnological approaches.

**Key words:** Durum wheat, water stress, PEG, germination, physiological traits, heat stable proteins, dehydrin, aquaporin, genic expression.

## ملخص

إن فهم و إدراك الآليات الجزيئية الخاصة بتحمل الجفاف لدى الحبوب، وعلى وجه الخصوص لدى القمح، تعتبر ذات أهمية بالغة من أجل الحد من الأثار الضارة للإجهاد المائي. استراتيجيات التكيف المتبعة تحدث تغيرات في برامج النسخ لتشكيله من الجينات. إن هذه الدراسة، قد استهدفت تحقيق دراسة مقارنة لسلوك بعض أصناف القمح الصلب، في الرد على الإجهاد المائي، على الصعيد الفسيولوجي، الكيموحيوي و الجزيئي، مع التركيز على تحليل ترجمة اثنان من جينات الاستجابة للإجهاد. أجريت ثلاث تجارب على أصناف من القمح الصلب الجزائري، اثنان منها تحت ظروف خاضعة لرقابة محكمة في غرفة نمو و الأخرى تحت ظروف شبه محكمة في مستنبت زجاجي. تحت ظروف الرقابة المحكمة، فرض الإجهاد المائي من خلال إضافة عنصر البولي- اتلين جليكول(PEG-6000) و تحت الظروف الشبه محكمة من خلال وقف الري. على المستوى الفسيولوجي و الكيموحيوي توصيف استجابة أصناف القمح اجري بناء على عدة مؤشرات : القدرة على الإنبات، طول الأوراق و الجذور، الحاصل (LR/LF)، المادة الجافة، المحتوى النسبي للماء، درجة حرارة الورقة، معدل الكلوروفيل، التوصيل الثغري، محتوى المحلول الكهربائي و محتوى السكريات الدائبة. كما أجريت مقارنة للبروتينات الثابتة تحت الحرارة (Protéines thermostables) بالهجرة الكهربائية ذات البعد الواحد (1D-SDS-PAGE) كشفت الدراسة المتبعة عن فروق ذات دلالة إحصائية بين الأصناف و حالة المياه بالنسبة لأغلبية العوامل المدروسة باستثناء : طول الأوراق و الجذور و درجة حرارة الورقة في وجود البولي ايتلين جليكول(PEG-6000). تسبب الإجهاد المائي في انخفاض قدرة الإنبات، اللذان أديا إلى انخفاض في إنتاج المادة الجافة. بالإضافة إلى انخفاض في المحتوى النسبي للماء الذي يترافق مع زيادة في مستويات محتوى المحلول الكهربائي، و السكريات الدائبة. الفروق الملحوظة في نطاقات البروتين التي كشفت عنها الهجرة الكهربائية تمس على حد سواء الوزن الجزيئي و الحدة. أجريت دراسة خاصة لتحليل مستوى ترجمة جين (AQP) و جين (DHN) في ظل ظروف مختلفة من الإجهاد المائي و على أنسجة مختلفة لصنفين من القمح الصلب (Belioni et Waha). لقد تمت ترجمة جين(DHN-5) في جذور، غمد و نصل الورقة عند النباتات المجهدة، بينما لم يتم العثور عليها مطلقا عند النباتات الشاهدة. في حين لوحظت ترجمة جين (TdPIP2,1) عند كلتا المجمعتان ( المجهدة و الشاهدة ) و لكن بمعدل اكبر عند النباتات المجهدة. علاوة على ذلك، كانت مستويات الترجمة لكلا الجينين اقوى عند الصنف ( Belioni ). الإفراط في التعبير لهذه الجينات يمكنه أن يؤدي إلى تحسين قدرة تحمل نقص المياه و إلى الاستجابة الخلوية المثلى، من أجل التغلب على الأضرار الناجمة عن العجز المائي و ذلك بفضل اليات متعددة. هناك علاقة وطيدة بين الآليات التي تحدث على المستوى الفسيولوجي، الخلوي و التي تحدث على المستوى الجزيئي. إن إبراز العلاقة الموجودة بين جينات الاستجابة للإجهاد الناشطة في نفس الوقت توفر بيانات ذات أهمية كبيرة لوضع نهج يعتمد على تقنيات بيوتكنولوجية أكثر تطورا و تفصيلا.

**الكلمات المفتاحية :** القمح الصلب، الإجهاد المائي، الانبات، الأوصاف الفسيولوجية، البروتينات الثابتة تحت الحرارة ( Protéines thermostables ) ، دهرين، اكوابورين، تعبير جيني

## Liste des tableaux

Titre du tableau	Page
Tableau.1. Localisation subcellulaire des protéines LEA-2 étudiées.	20
Tableau.2. Liste des génotypes étudiés et leurs origines.	34
Tableau.3. Poids moléculaire des protéines de référence du Kit LMW ( <i>Low Molecular Weight</i> ).	43
Tableau.4. Amorces utilisées pour l'analyse d'expression.	50
Tableau.5. Carrés moyens de l'analyse de variance du pourcentage de germination après 24h (G24), après 72h (G72) et le pourcentage de germination final (G%) des variétés de blé dur testées.	54
Tableau.6. Taux de germination après 24h (%) sous condition contrôle (0MPa) et en présence de PEG-6000 (-0,6MPa et -1,2MPa).	55
Tableau.7. Taux de germination après 72h (%) sous condition contrôle (0MPa) et en présence de PEG (-0,6MPa et -1,2MPa).	55
Tableau.8. Evolutions des longueurs foliaires (cm) sous condition contrôle (0MPa) et en présence de PEG (-0,6MPa et -1,2MPa).	58
Tableau.9. Carrés moyens de l'analyse de variance des longueurs foliaires (LF), des longueurs racinaires (LR) et du nombre de racines (NRB) des variétés de blé dur testées.	58
Tableau.10. Ratio longueur racinaire sur longueur foliaire (LR/LF).	59
Tableau.11. Carrés moyens de l'analyse de variance de la teneur relative en eau (TRE), du taux de chlorophylle (SPAD index), de la température foliaire (Tf) et de la matière sèche (MS) des variétés de blé dur testées.	68
Tableau.12. Carrés moyens de l'analyse de variance de la teneur en sucre (Suc) des variétés de blé dur testées.	70
Tableau.13. Carrés moyens de l'analyse de variance, pour l'interaction (Génotype x Traitement x Durée, de la teneur relative en eau (TRE), de la température foliaire (Tf), de la teneur en chlorophylle (SPAD) de la matière sèche (MS) et de la teneur en sucres solubles (Suc) des variétés de blé dur testées.	71
Tableau.14. Carrés moyens de l'analyse de variance de la conductance stomatique (g <sub>s</sub> ) des variétés de blé dur testées.	75
Tableau.15. Evolution du contenu en chlorophylle (SPAD index) sous condition contrôle (C) et sous condition de stress hydrique (S) des différentes variétés de blé dur.	77
Tableau.16. Carrés moyens de l'analyse de variance de la température foliaire (Tf), de la teneur en chlorophylle (SPAD index), de la teneur relative en eau (TRE) et la conductivité électrolytique (EL) des variétés de blé dur testées.	81

## Liste des figures

Titre de la figure	Page
Figure.1. Mécanismes de réponse des plantes à un stress abiotique.	10
Figure.2.Représentation schématique d'une déhydrine (YSK <sub>2</sub> ) de l'orge.	18
Figure.3.Fonctions des déhydrines en relation avec les données expérimentales.	23
Figure.4.Topologie d'une aquaporine à travers la membrane.	26
Figure.5.Model d'une aquaporine en forme de sablier.	27
Figure.6.Schématisation de la démarche expérimentale illustrant l'organisation de l'ensemble des essais réalisés.	35
Figure.7.Thermomètre infrarouge portatif model (IL, USA).	38
Figure.8. Chlorophylle mètre Minolta SPAD 502 ( <i>Spectrum technology Inc, IL, USA</i> ).	39
Figure.9. Courbe d'étalonnage des sucres solubles.	41
Figure.10.Poromètre à diffusion de vapeur type <i>Delta Devices MK3<sup>R</sup></i> .	45
Figure.11.Conductimètre de type LF 92 ( <i>WTW GmbH, Germany</i> ).	46
Figure.12.Schématisation des étapes successives de la quantification des transcrits par RT-PCR semi-quantitative.	48
Figure.13. Effet des différentes concentrations de PEG-6000 sur le pourcentage de germination des graines (moyenne des sept variétés de blés durs).	53
Figure.14. Evolution de la capacité de germination sous condition contrôle (C) et sous différentes conditions de stress hydrique (PEG-6000 à 10% et à 20%) chez les variétés de blé dur étudiées. Les valeurs constituent les moyennes+SD (n=3).	54
Figure.15. Evolution de la longueur racinaire sous condition contrôle (C) et sous différentes conditions de stress hydrique (PEG-6000 à 10% et à 20%) chez les variétés de blé dur étudiées. Les valeurs constituent les moyennes+SD (n=3).	57
Figure.16. Evolution de la longueur racinaire sous condition contrôle (C) et sous différentes conditions de stress hydrique (PEG-6000 à 10% et à 20%) chez les variétés de blés durs étudiées.	59
Figure.17. Effet de la durée d'exposition au PEG a 10% sur la température foliaire (moyenne des sept variétés étudiées).	63
Figure.18. Variation de la température foliaire des sept variétés de blé dur étudiées en fonction de la durée d'exposition (en jours) au PEG a 10%.	64
Figure.19. Evolution du taux de chlorophylle sous condition contrôle (C) et sous condition de stress hydrique osmotique (10% et 20% de PEG) des différentes variétés de blé dur durant trois jours. Les valeurs représentent les moyennes +SD, n=3.	65
Figure.20. Effet de la durée d'exposition au PEG a 10% sur le taux de chlorophylle (SPAD index) des sept variétés de blé dur étudiées.	66
Figure.21. Evolution de la teneur relative en eau sous condition contrôle (C) et sous condition de stress hydrique osmotique (10% et 20% de PEG) des différentes variétés de blé dur durant cinq jours. Les valeurs représentent les moyennes +SD, n=3.	68
Figure.22. Variation de la teneur en sucres des sept variétés de blé dur étudiées en fonction de la concentration en PEG (0, 10 et 20%) sur une durée de cinq jours.	70
Figure.23.A. Profil en 1D SDS-PAGE des protéines thermostables de variétés de blés durs extraites à partir des feuilles sous différentes conditions de stress chez les variétés B et W.	72
Figure.23.B. C. Profil en 1D SDS-PAGE des protéines thermostables de variétés de blé dur extraites à partir des feuilles sous différentes conditions de stress. Chez les variétés GGR,	73

DK, B17 et Bou.	
Figure.23.D. Profil en 1D SDS-PAGE des protéines thermostables de variétés de blé dur extraites à partir des feuilles sous différentes conditions de stress. Chez les variétés B17, GGR, DK et Bou.	74
Figure.24. Evolution des températures foliaires sous condition contrôle (C) et sous condition de stress hydrique (S) des différentes variétés de blé dur. Les valeurs représentent les moyennes +SD, n=3.	76
Figure.25. Evolution des teneurs relatives en eau sous condition contrôle (C) et sous condition de stress hydrique (S) des différentes variétés de blé dur. Les valeurs représentent les moyennes +SD, (n=3).	79
Figure.26. Evolution des conductivités électrolytiques (EL) sous condition contrôle (C) et sous condition de stress hydrique (S) des différentes variétés de blé dur. Les valeurs représentent les moyennes +SD, (n=3).	80
Figure.27. Relation entre le taux d'électrolytes (EL) et la teneur relative en eau (TRE) chez les sept variétés étudiées.	81
Figure.28. Analyse RT-PCR de A) le gène aquaporine (TdPIP2,1) et B) le gène déhydrine (DHN5) à partir de différents tissus végétaux de deux variétés de blé dur (B : Beliouni et W : Waha) sous conditions contrôles (C) et en présence de PEG (10%, 20%).	94
Figure.29. Analyse RT-PCR de A) le gène aquaporine (TdPIP2,1) et B) le gène déhydrine (DHN5) à partir de différents tissus végétaux de deux variétés de blé dur (B :Beliouni et W : Waha) en condition contrôle (C) et en condition de stress hydrique (D).	94

## Liste des abréviations et des acronymes

**ABA:** acide abcissique.  
**ADNc ou c-DNA :** ADN complémentaire.  
**APS :** persulfate d'ammonium.  
**ARN ou RNA:** acide ribonucléique.  
**BBP :** bleu de bromophénol.  
**bp :** paire de base.  
**BSA :** bovine sérum albumine = albumine de sérum de bœuf.  
**C %:** "cross-linking", Bisacrylamide (g)/ (Acrylamide+Bisacrylamide) (g) x100.  
**D :** acide aspartique.  
**DEPC:** Di-Ethyl-Pero-Carbonate.  
**DHN-5:** Déhydrine 5.  
**dNTP:** Désoxy-Nucléosine-Triphosphate.  
**Do :** densité optique.  
**DTT :** dithiothréitol.  
**E :** acide glutamique.  
**EDTA:** Ethylène Diamine Tétra-Acétate.  
**FAO :** Food and Agriculture Organization.  
**G :** glycine.  
**g<sub>s</sub> :** Conductance stomatique  
**h :** heure.  
**I :** isoleucine.  
**ITGC :** Institut Technique des Grandes Cultures.  
**J :** jours.  
**K :** lysine.  
**KDa :** kilo dalton.  
**L :** leucine.  
**LEA:** Late Embryogenesis Abundant.  
**M :** méthionine.  
**m<sup>2</sup>.s/mol :** mètre au carrée .second / mol.  
**mA :** milliampère.  
**M-MLV :** Moloney Murine Leukemia Virus.  
**mn :** minute.  
**MPa :** megapascal.  
**N :** asparagine.  
**nm :** nanomètre.  
**P :** proline.  
**PEG :** polyéthylène glycol.  
**PF :** poids frais.  
**PM :** poids moléculaire.  
**PS :** poids sec.  
**PT :** poids de turgescence.  
**qsp :** quantité suffisante pour.  
**ROS :** Espèces Réactives d'oxygène.  
**rpm :** rotation par minute.  
**rs :** Résistance stomatique.  
**RT-PCR :** Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction.  
**SDS-PAGE :** Sodium Dodécylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.  
**T % :** «concentration totale » Acrylamide + Bisacrylamide (g)/Total x 100.



**T** : thréonine.

**TCA** : acide trichloroacétique.

**TCT** : taux de chlorophylle totale.

**Td PIP2 ;1** : Triticum durum Plasma intrinsec Protein.

**TEMED** : tétraméthyl-éthylène-diamine.

**TRE** : teneur relative en eau.

**Tris** : tris-hydroxyméthyl-aminométhane.

**V** : valine.

**Y** : tyrosine.

## */Sommaire*

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des tableaux	
Listes des figures	
Listes des abréviations et des acronymes	
Introduction générale	1
Chapitre 1: Revue bibliographique	
I-Le blé	4
1. Présentation du blé	4
2. Positionnement vis-à- vis des enjeux économiques	4
II-Sécheresse facteur limitant la production et tolérance	5
1. Changement climatique et conséquences	5
2. La sécheresse, l'un des principaux facteurs limitant la production	6
3. Effet de la sécheresse et stratégies d'adaptation	7
3.1. Effet de la sécheresse	7
3.2. Stratégies et mécanismes d'adaptation	8
3.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse au stress	9
3.4. Perception et signalisation d'un stress hydrique	10
3.5. Les gènes et leurs produits induits en cas de stress hydriques	11
3.5.1 .Accumulation des osmolytes	12
3.5.1.1. <i>La proline</i>	12
3.5.1.2. <i>Les sucres</i>	12
3.5.2. Les enzymes de détoxication	13
3.5.3. Les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant)	13
3.5.4. Les protéines MIP (Major Intrinsic Proteins)	14
III-Les protéines déhydrines	15
1. Description des protéines déhydrines	15
2. Structure des protéines déhydrines	16
3. Gènes codant les protéines déhydrines, diversités et abondances	19
4. Localisation subcellulaire des protéines déhydrines	19
5. Rôles fonctionnels des protéines déhydrines	20
6. Bases de données	23
7. La déhydrine DHN5 du blé dur	24
IV-Les protéines aquaporines	24
1. Description des protéines aquaporines	24
2. Structure des protéines aquaporines	25
3. Gènes codant les protéines aquaporines, diversités et abondances	27
4. Localisation subcellulaire des protéines aquaporines	28

5. Rôles fonctionnels des protéines aquaporines	29
6. L'aquaporine PIP2	31
V-Etude des mécanismes moléculaires de réponse au stress	31
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	
1. Matériel végétal	34
2. Conduite et organisation des essais	34
3. Effet du déficit hydrique osmotique induit par le polyéthylène glycol PEG-6000	35
3.1. Cultures et traitements	35
3.1.1. Le polyéthylène glycol 6000	36
3.1.2. Germination	37
3.1.3. Culture hydroponique et induction de la contrainte hydrique	37
3.2. Mesure de la température foliaire	38
3.3. Taux de chlorophylle total (SPAD index)	39
3.4. Mesure de la matière sèche	39
3.5. Détermination du statut hydrique (TRE)	40
3.6. Dosage des sucres solubles	41
3.7. Traitement et analyse statistique	41
3.8. Analyse des protéines thermostables	41
3.8.1. Extraction des protéines thermostables	42
3.8.2. Séparation des protéines sur gel 1D SDS-PAGE	43
3.8.3. Conditions de migration et révélation des gels	43
3.8.4. Traitement des données	43
4. Effet du déficit hydrique induit par un arrêt de l'arrosage	43
4.1. Conditions de culture	44
4.2. Application des niveaux de stress	44
4.3. Mesure de la température foliaire	44
4.4. Teneur en chlorophylle totale	44
4.5. Conductance stomatique	44
4.6. Conductivité électrolytique	45
4.7. Détermination de la Teneur Relative en Eau	46
4.8. Traitement et analyse statistique	46
5. Analyse d'expression des gènes candidats : l'aquaporine TdPIP2,1 et la déhydrine DHN-5	47
5.1. Extraction des ARN totaux foliaires par la méthode du Trizol	47
5.2. Synthèse des ADNc par transcriptase reverse	49
5.3. Amplification PCR des ADNc	49
5.4. Electrophorèse sur gel d'agarose	50
Chapitre 3 : Caractérisation de la réponse au stress hydrique chez quelques variétés de blé dur ( <i>Triticum durum</i> . Desf)	
Introduction	51
Résultats	53
1. Effet du déficit hydrique osmotique induit par le polyéthylène glycol-6000 sur le processus de germination	53
1.1. Capacité de germination des graines	53
1.1.1. Taux de germination après 24h et après 72h	55

1.2. Evolution des longueurs racinaires (LR)	56
1.3. Evolution des Longueurs foliaires (LF)	57
1.4. Rapport des longueurs racinaires sur les longueurs foliaires (LR/LF)	58
1.4. Nombre de racines (NRB)	59
Discussion	60
2. Effet du déficit hydrique osmotique induit par le polyéthylène glycol-6000	63
2.1. Evolution de la température foliaire	63
2.2. Evolution de la teneur en chlorophylle totale (SPAD index)	64
2.3. Evolution de la matière sèche	66
2.4. Evolution de la teneur relative en eau	67
2.5. Détection et évaluation de quelques caractères biochimiques	69
2.5.1. Evolution des teneurs en sucres solubles	69
2.5.1. Profils électrophorétiques 1D SDS-PAGE des protéines thermostables foliaires	71
3. Effet du déficit hydrique induit par l'arrêt de l'arrosage	74
3.1. Evolution de la conductance stomatique	74
3.2. Evolution de la température foliaire	75
3.3. Evolution de la teneur en chlorophylle	76
3.4. Evolution de le teneur relative en eau	78
3.5. Evolution de la conductivité électrolytique	79
Discussion	81
Conclusion	90
Chapitre 4 : Analyse de l'expression de deux gènes de réponse au stress chez deux variétés de blé dur	
Analyse de l'expression du gène TdPIP 2 ;1 et du gène DHN-5 chez deux variétés de blé dur	91
Introduction	91
Résultats	93
1. Effet du stress hydrique sur l'expression du gène TdPIP 2 ; 1	93
2. Effet du stress hydrique sur l'expression du gène DHN-5	93
Discussion	95
Conclusion	99
Chapitre 5 : Valorisation et productions scientifiques	
Article	100
Résumés des communications	109
Conclusion générale et perspectives	113
Références bibliographiques	116
Annexes	

*/Introduction générale*

### Introduction générale

Historiquement, l'origine de la culture du blé se confond avec les débuts de l'agriculture. Cette céréale ayant été très tôt domestiquée, cultivée et sélectionnée par l'homme, occupe une place prépondérante dans son alimentation. Toutefois en terme de production, elle reste très dépendante des conditions climatiques. La production du blé en région méditerranéenne est grandement influencée par les stress abiotiques incluant la sécheresse. Cette culture essentiellement pluviale, très répandue est soumise à des régimes pluviométriques variables et faibles. Une contrainte environnementale qui se voit être d'autant plus marquée par les effets du changement climatique. D'après le rapport établi par un groupe d'experts intergouvernementaux, le réchauffement climatique est sans équivoque, avec comme conséquence, une hausse de la fréquence ainsi que de la sévérité des événements : de température extrême, du CO<sub>2</sub> atmosphérique et des épisodes de sécheresse (Parry *et al.*, 2007 ; Cattivelli *et al.*, 2010). Des événements qui pourraient passer d'un statut de phénomène exceptionnel à un statut de phénomène récurrent.

Comprendre la réponse des plantes, à leur environnement externe est d'une grande importance, en ce qui concerne la recherche fondamentale mais aussi en tant que voie d'amélioration de la tolérance au stress. En temps qu'organisme sessile, les plantes ont développé diverses stratégies adaptatives leur permettant de faire face aux stress environnementaux. L'intérêt que portent les chercheurs aux aspects physiologiques, biochimiques et moléculaires de la réponse des plantes au stress est grandement justifiable. Apportant ainsi, des connaissances pouvant être applicables sur le plan pratique pour le développement d'espèces agricoles tolérantes à la sécheresse. Dans ce domaine beaucoup de travaux ont été développés, couvrants divers aspects, avec comme principal objectif, comprendre l'aptitude des plantes à croître et à survivre en conditions limitantes. Mais, malgré tous les efforts déployés à cet effet, il reste encore beaucoup à faire. La complexité génétique des mécanismes de tolérance au stress hydrique rend la tâche d'autant plus difficile. Pour cette raison, les biotechnologies doivent être complétées par les procédés d'amélioration et de physiologie classique (Gupta *et al.*, 2014). Il existe une forte connexion entre les modifications se produisant au niveau moléculaire et cellulaire et celles se produisant au niveau physiologique. Ces modifications sont régies par tout un assortiment de gènes, dont l'expression résulte en des changements dans les programmes transcriptionnels, conduisant à la synthèse de nouvelles protéines, incluant les déhydrines (Bhargava et Sawant., 2013).

## Introduction Générale

En analysant la variation d'expression sous l'effet d'un stress hydrique dans différents génotypes, cela permettrait de mettre en évidence des gènes ou des protéines candidates, dont la variation d'expression pourrait être la cause des variations phénotypiques entre génotypes analysés. Ces candidats peuvent ensuite être utilisés à des fins d'amélioration (Jeannaux et *al.*, 2002).

Dans ce contexte, le présent travail se propose d'effectuer une étude comparative des aspects de la réponse morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire, relatifs aux effets d'une contrainte hydrique. Une attention particulière sera portée sur l'étude du profil d'expression de deux gènes de réponse au stress hydrique, un gène déhydrine (DHN-5) et un gène aquaporine (TdPIP2;1). Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche national (projet PNR) développé par l'équipe II de Biotechnologie et Amélioration des Plantes.

Le mémoire de thèse est structuré en quatre grands chapitres.

Le chapitre 1 : consiste en une synthèse bibliographique se focalisant sur les mécanismes des réponses physiologiques et moléculaires des plantes au stress hydrique. L'intérêt des techniques de transcriptomique pour la détection et l'analyse d'expression des gènes d'adaptation à la sécheresse sera traité brièvement. Cette partie bibliographique est à son tour structurée en quatre parties :

- La 1<sup>ère</sup> partie consiste en la présentation des caractéristiques botaniques ainsi que l'importance économique de l'espèce étudiée.
- La 2<sup>ème</sup> partie traite des réponses des plantes au stress. En décrivant les conséquences de la sécheresse sur les plantes ainsi que les gènes et leurs produits induits en réponse au stress hydrique.
- La 3<sup>ème</sup> partie passe en revue les gènes codant les déhydrines et les aquaporines, leurs structures, leurs localisations cellulaires et leurs rôles fonctionnels.
- La 4<sup>ème</sup> partie traite de l'étude des mécanismes moléculaires de réponse au stress hydrique.

Le chapitre 2 : détaille les principales méthodologies utilisées en passant par la description du matériel végétal, le dispositif expérimental ainsi que les techniques utilisées pour l'analyse de la réponse au stress hydrique.

Le chapitre 3 : portant sur la caractérisation de la réponse de quelques variétés de blé dur au stress hydrique, il rassemble l'ensemble des résultats produits pour cette partie et leurs interprétations.



## **Introduction Générale**

Le chapitre 4 : portant sur l'analyse de l'expression moléculaire de deux gènes de réponse au stress hydrique, le gène DHN-5 et le gène TdPIP2,1.

Le chapitre 5 : portant sur la valorisation du travail effectué et la production scientifique.

## *Chapitre 1 | Revue bibliographique*

## I-Le blé

### 1. Présentation du blé

L'appellation blé regroupe un nombre important d'espèces appartenant (selon leur classification hiérarchique) aux angiospermes (plantes à fleurs), monocotylédones de la famille des *Poaceae* (graminées) de la sous famille des *Pooideae* et de la tribu des *Triticeae*. De nombreuses espèces de cette famille ont été domestiquées et possèdent un très grand intérêt agronomique, tel que le riz, le maïs, le sorgho, l'avoine, l'orge et le blé (Charles., 2010). Quelques-unes de ces espèces font l'objet de projets de séquençage complet. Certains sont achevés, tel que le projet '*International Rice Genome Sequencing Project 2005*'. D'autres sont sur le point d'être achevés, tel que le projet '*Consortium for Maize Genomics*'. S'ensuivra le séquençage de plus grand génome comme le blé (Charles., 2010). Les données fournies par ces projets de séquençage auront des débouchés majeurs, aussi bien en génomique structurale qu'en génomique fonctionnelle.

On distingue deux espèces de blé principalement cultivées :

-Le blé tendre (*Triticum aestivum*) hexaploïde possédant trois génomes apparentés AA, BB et DD, comportant 42 chromosomes ( $2n=6x=42$ ), avec environ  $16 \times 10^9$  pb. Il constitue un matériel difficile à étudier sur le plan génomique (Gupta et al., 2002). Son albumen est relativement friable ce qui lui donne une aptitude à la transformation en farine.

-Le blé dur (*Triticum durum*) tétraploïde, possédant deux génomes AA et BB, comportant 28 chromosomes ( $2n=4x=28$ ) (Bataillon et al., 2006). Son albumen dur, le rend plus apte à donner des semoules, qui à leur tour sont utilisées pour la fabrication de pâtes alimentaires. Ces deux blés appartiennent au genre *Triticum* (Feillet., 2000).

### 2. Positionnement vis-à-vis des enjeux économiques

Les céréales ont été considérées par l'homme depuis des millénaires comme des produits d'intérêt nutritionnel. Le blé étant l'espèce la plus représentative, la plus cultivée et la plus consommée. En effet, cette céréale est un composant essentiel du régime alimentaire de nombreux pays. Elle est considérée comme étant la première source de glucides et de calories. Quant à ses protéines, elles constituent, elles aussi la majeure partie des protéines consommées dans de nombreuses régions (Jeantet et al., 2007).

Contrairement aux autres fruits et baies, le blé doit être préalablement transformé avant d'être consommé. On distingue alors :

- Les produits de première transformation céréalière : farines, semoules, grains décortiqués ou abrasés, flocons, malt.

-Les produits de deuxième transformation céréalière issus de la panification (pizzas, pains à hamburgers, viennoiseries, biscuiteries, pâtisseries), la pastification, la crêperie, l'amidonnerie.

-Pour finir les industries de l'alimentation animale entrent aussi dans ces filières céréalières.

Les programmes d'amélioration du blé dur visaient jusque-là, la sélection de lignées uniquement pour leur aptitude à la pastification. Des essais montrent que la sélection, en fonction de la qualité boulangère, permet l'obtention de variétés de blé dur à double usage pastification et panification (Dexter., 2008).

Le blé fait partie (avec le maïs et le riz) des céréales les plus cultivées, avec une production mondiale d'environ 2523 millions de tonnes en 2014 (FAO., 2014). Ceci rend compte de la place capitale qu'occupe le blé dans notre alimentation, encore plus, suite à l'expansion du marché de la restauration rapide. Ce qui pousse les industriels, face à ce marché très lucratif, à être de plus en plus exigeant en terme de qualité et de quantité et ce, malgré les contraintes posées par les conditions climatiques.

Les pays arabes d'Afrique du Nord seront affectés par les changements climatiques et phénomènes météorologiques extrêmes dans les années à venir, obérant inévitablement leurs productions agricoles et les récoltes en blé. Les mauvaises conditions climatiques risquent de provoquer une forte hausse des prix du blé, dont les cours internationaux connaissent de fortes inflations (Abis., 2012). Immanquablement, la hausse des matières premières va se répercuter sur les produits à base de céréales, qui verront leurs coûts de surcroît augmentés.

## **II-Sécheresse facteur limitant la production et tolérance**

### **1 .Changement climatique et conséquences**

Depuis quelques années, des études ont été menées afin de vérifier, si une évolution rapide du climat était en cours au niveau mondial. Que ce soit par l'enregistrement et l'analyse des relevés de précipitations, de températures ou des concentrations atmosphériques en différentes molécules. L'ensemble des facteurs étudiés, confirme une évolution rapide et globale du climat (Chaumeil., 2006).

Il ressort des prospectives faites par un groupe d'experts intergouvernementaux, que le réchauffement du système climatique est sans équivoque et imputable en grande partie, à

l'émission des gaz à effet de serre (Bates et *al.*, 2008 ; Cattivelli., 2010 ; Bhargava et Swant., 2013). La hausse des températures, l'augmentation du CO<sub>2</sub> atmosphérique, la diminution des précipitations, l'augmentation en nombre et en intensité des événements extrêmes entraînent déjà : la fonte des glaciers, l'élévation du niveau de la mer, et le changement des aires de répartition de certaines espèces végétales (Pachauri et Reisinger., 2007). Tous ces éléments pourraient ainsi, se superposer et affecter le secteur agricole, en particulier dans un contexte d'une croissance significative de la population globale (Ahuja et *al.*, 2010). L'agriculture est le secteur économique, pour lequel les épisodes de sécheresse se traduiront par les pertes les plus élevées ; en ce sens, où elles auront des répercussions directes sur la production et le rendement des grandes cultures (Plan Bleu., 2008). Ne dérogeant pas à la règle générale, la région méditerranéenne sera, elle aussi sujette aux effets du changement climatique, avec ce qui s'avère être l'une des contraintes les plus limitantes de la production céréalière, l'aggravation du déficit pluviométrique.

### **2. La sécheresse, l'un des principaux facteurs limitant la production**

Les stress abiotiques constituent les principaux facteurs limitant la production des grandes cultures (Wang et *al.*, 2003 ; Landridge et *al.*, 2006). Ces derniers, ainsi que leurs effets font l'objet d'une attention grandissante, dans un contexte climatique changeant (Vinocur et Altman., 2005 ; Verslues et *al.*, 2006).

Le déficit hydrique est l'un des premiers facteurs entraînant, une diminution des rendements et par conséquent une diminution de la production, aussi bien en Algérie (Benbelkacem et Kellou., 2001 ; Megherbi et *al.*, 2012), en Tunisie (Slama et *al.*, 2005) qu'au Maroc (Zerrad et *al.*, 2008). Lorsqu'un stress hydrique survient, les récoltes céréalières peuvent baisser considérablement et les compagnes céréalières se voient dans l'obligation de faire appel à l'importation, afin de combler la différence et couvrir la consommation.

Entre, les compagnes 2004/2005 et 2011/2012, les importations en blé ont augmenté de 20% en Afrique du Nord. D'ailleurs, pour ce sous-ensemble géographique (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Egypte), la consommation locale de blé s'est accrue de 28% entre 2004 et 2011. Avec 10 millions de tonnes, l'Egypte est le 1<sup>er</sup> pays importateur de blé au monde. L'Algérie se situe au 5<sup>ème</sup> rang, suivi du Maroc au 14<sup>ème</sup> rang et de la Tunisie au 21<sup>ème</sup> rang (Abis., 2012).

Les perspectives visent l'accroissement du rendement dans les zones à environnement défavorable, via le développement de cultivars à adaptation spécifique (Benbelkacem et Kellou., 2001).

### 3. Effet de la sécheresse et stratégies d'adaptation

#### 3.1. Effet de la sécheresse

L'eau étant un composant pondéral essentiel à la plante. Le stress hydrique va affecter plusieurs variables de fonctionnement de celle-ci, telle que la température foliaire, la conductance stomatique, la photosynthèse, ou encore la surface foliaire (Najim., 2008). Il s'accompagne également d'une perte de turgescence, d'une concentration des solutés, d'une altération de la forme de la membrane (voire une rupture de l'intégrité membranaire), d'une production d'espèces réactives d'oxygènes (ROS) et d'une dénaturation des protéines (Bray., 1997).

La quasi-totalité des régions, assurant la production du blé dans le monde, sont sujettes à un déficit hydrique, durant une étape ou une autre de son cycle de développement. Une contrainte hydrique se traduit par une réduction de la croissance de la plante et ou de la productivité par rapport au potentiel du génotype, ne pouvant alors s'exprimer totalement (Benseddik et Benabdeli., 2000).

Les performances de production d'un blé, autrement dit son rendement, dépendent principalement de trois composantes : du nombre de grain par épis, du poids des grains par épis et du nombre d'épis par m<sup>2</sup>. Un déficit hydrique affectera le rendement (donc ses trois composantes) selon sa sévérité et selon le stade au cours duquel il survient (Lopez et *al.*, 2003). A la montaison, il entraîne la chute du nombre d'épis par m<sup>2</sup>, la régression intense des talles et ou la baisse du nombre de grains par épis. A la fin de la montaison (10-15 jours avant l'épiaison) la sécheresse réduit le nombre de feuilles fertiles par épis. Le manque d'eau après la floraison (combiné à des températures élevées) entraîne une diminution du poids de 1000 graines et au cours du remplissage du grain, une réduction de la taille des graines (Slama et *al.*, 2005).

Dans la mesure où le déficit hydrique peut survenir à n'importe quelle étape du cycle biologique du blé, les plantes doivent disposer de mécanismes d'adaptation, leur permettant de supporter la sécheresse.

### 3.2. Stratégies et mécanismes d'adaptation

Etant des organismes sessiles, les plantes ont dû développer des mécanismes, leur permettant d'assurer à la fois leur survie et leur reproduction, en conditions de sécheresse. Les principales stratégies sont l'esquive, l'évitement et la tolérance (Chavez et *al.*, 2003).

Les plantes qui pratiquent l'esquive, vont développer une stratégie qui leur permet de réduire ou d'annuler l'effet du déficit hydrique, en adaptant leur cycle de culture à la longueur de la saison des pluies (Clavel et *al.*, 2005 ; Slama et *al.*, 2005). Réduisant ainsi les risques de perte du rendement mais, avec comme conséquence, une réduction du rendement maximal (Virlovet., 2011). Une floraison précoce permet à la plante de contourner la période de la sécheresse (Christensen et Feldmann., 2007). Pour ce qui est des céréales, elle consiste à décaler la date de semis et ou à sélectionner des variétés précoces, afin d'éviter le déficit hydrique de fin de cycle (Ben Naceur et *al.*, 1999). La précocité assure une meilleure efficacité de l'utilisation de l'eau. En produisant plus de biomasse, les génotypes à croissance rapide et à maturité précoce utilisent mieux l'eau disponible ; ils sont moins exposés aux stress hydriques que les génotypes tardifs (Slama et *al.*, 2005). Mais la sécheresse est imprévisible et les plantes finissent inexorablement par être confrontées au stress.

La seconde stratégie employée par les plantes, l'évitement. Elle consiste à faire en sorte d'éviter ou de retarder une déshydratation des tissus, tout en maintenant un potentiel hydrique le plus élevé possible (Clavel et *al.*, 2005). Elle est assurée par des caractères adaptatifs, permettant la réduction des pertes, couplée à une meilleure récupération de l'eau. La perte en eau par transpiration, peut-être minimisée par la réduction de la surface foliaire, obtenue par l'enroulement des feuilles ou encore l'élimination des feuilles les plus âgées et une diminution de la croissance (Slama et *al.*, 2005 ; Tahi., 2008) ; ainsi que par la réduction de la conductance stomatique (Djekoun et Plonchon., 1991). Toutefois, cela peut engendrer une réduction de la photosynthèse. Ainsi, les génotypes dont la capacité photosynthétique demeure la moins affectée par le stress hydrique, présentent une plus grande efficacité de l'utilisation de l'eau et une plus grande capacité de survie (Ykhlef et Djekoun., 2000). La récupération de l'eau, est quant à elle faite via une augmentation du système racinaire (Sharp et *al.*, 2004) et ce suite, à une allocation des ressources, en faveur de la croissance racinaire (Durand., 2009). Cette stratégie permettra aux plantes d'assurer leur survie au dépend de leur productivité.

La tolérance est une stratégie qui permet à la plante d'assurer l'ensemble de ses fonctions biologiques, malgré un déficit hydrique (Virilouvet., 2011). Maintenir la turgescence, en condition de contrainte hydrique permet de retarder la fermeture des stomates, donc une fonction prolongée de la photosynthèse, un maintien du volume chloroplastique et une réduction du flétrissement foliaire (Kiani., 2007). Parmi les mécanismes adaptatifs mis en place à cet effet, l'ajustement osmotique (Clifford et *al.*, 1998) couplé à un système antioxydant efficace (Batlang., 2010), l'efficacité de l'utilisation de l'eau (Bonhomme et *al.*, 2009) ou encore une modification de la conductivité hydraulique (Jones et *al.*, 2004). Ces mécanismes s'illustrent particulièrement, chez les plantes dites de résurrection (*ressurrection plants*), qui peuvent survivre à la perte de 89% de leur eau (Farrant., 2000).

Il est cependant important, de préciser que ces stratégies ne sont pas mutuellement exclusives. En effet, à l'échelle moléculaire, il existe un ensemble de réponses ne rentrant pas exclusivement dans l'une de ces catégories et pouvant se combiner (Tahi., 2008 ; Batlang., 2010). A titre d'exemple : les protéines de stress, les déhydrines peuvent agir en tant que molécules protectrices (Close., 1997), mécanisme de tolérance et possèdent en même temps la faculté de retenir les molécules d'eau (Reyes et *al.*, 2008), mécanisme d'évitement.

### **3.3. Mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse au stress**

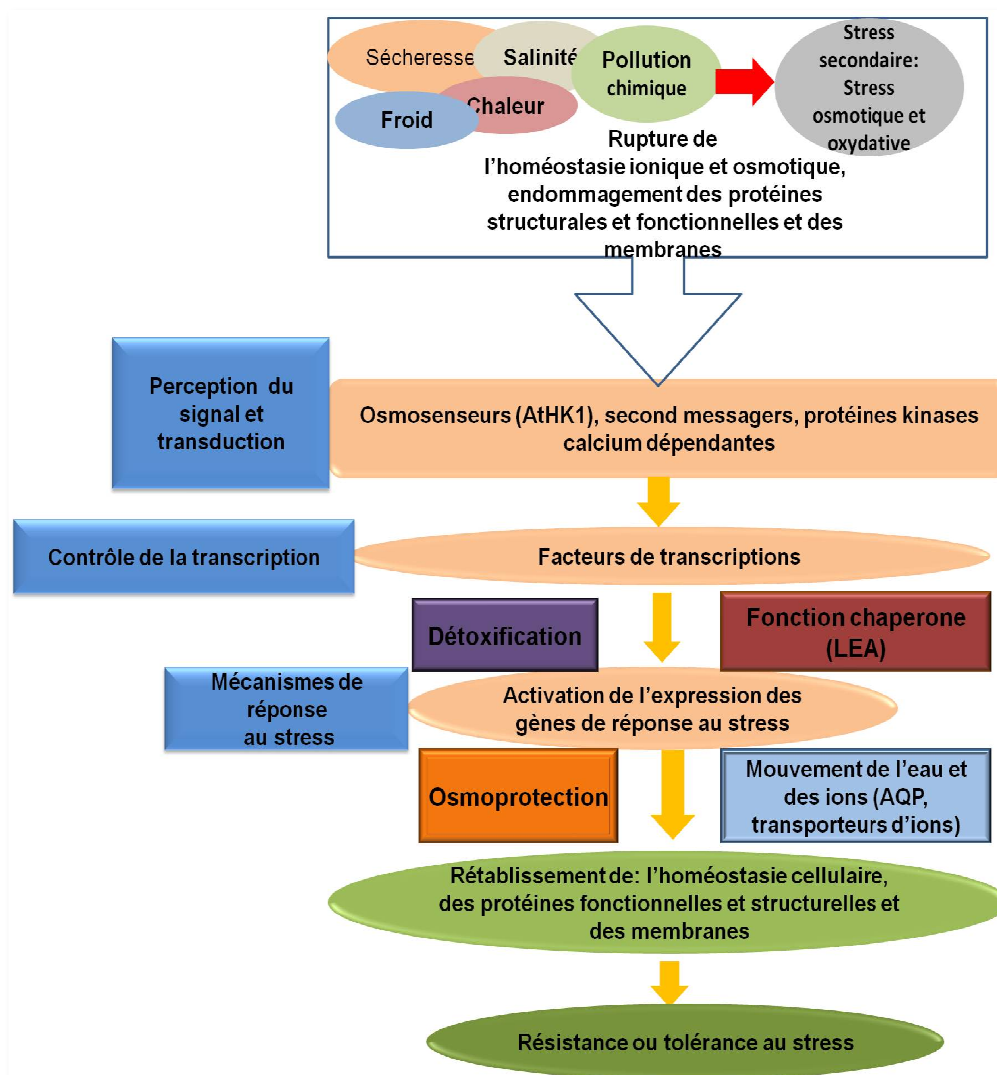
La réponse des plantes au stress hydrique est complexe. Elle reflète l'intégration de variétés de mécanisme sous-jacents, à différents niveaux d'organisation (Yordanov et *al.*, 2000). Sur le plan moléculaire, elle se manifeste par l'induction d'un ensemble de gènes, dont les produits vont permettre à la plante, de faire face à la carence hydrique. Cette dernière, n'est donc pas monogénique, mais implique l'intervention de multiples gènes assurant une réponse graduelle et coordonnée (Bertrand., 2009).

Le profil d'expression des gènes de réponse aux stress hydriques est très complexe. Ces gènes sont régis par deux voies de signalisation : ABA dépendante et ABA indépendante et peuvent être induits rapidement dans la perception du stress ou lentement suite à l'accumulation de l'ABA (Shinozaki et *al.*, 2003 ; Chaves et *al.*, 2003). L'accumulation de l'ABA active plusieurs gènes associés aux stress, dont les produits peuvent être des protéines fonctionnelles ou des protéines de régulations. La voie ABA indépendante reste encore peu connue (Bray., 1994).

Malgré le caractère plus ou moins universel de la réponse au stress, il existe des différences très nettement perceptibles entre espèces. De même que, pour une même plante, l'expression de tel ou tel gène sera dépendante du tissu, du type cellulaire, du stade de développement



(Bray et *al.*, 1997), mais aussi du type de stress appliqué. Sur un total de 806 gènes testés (à l'aide de puce à ADN), pour un stress hydrique appliqué selon trois méthodologies (séchage à l'aire sur papier filtre sec, application du mannitol en culture hydroponique et arrêt d'arrosage), seuls 27 gènes sont induits de manière commune, aux trois expérimentations (Bray., 2004).



**Figure.1.** Mécanismes de réponse des plantes, à un stress abiotique (adapté de Wang et *al.*, 2003).

### 3.4 .Perception et signalisation d'un stress hydrique

Afin que la cellule puisse réagir au déficit hydrique, elle doit avant tout convertir les signaux perçus au niveau physique, en signaux biochimiques, perçus alors au niveau moléculaire, entraînant une transduction du signal (Virlovet., 2011).

D'un point de vue temporel, la perception du stress est suivie de changement de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  et de l'accumulation de second messenger, induisant des cascades de signalisations. Ces cascades vont moduler l'action de facteurs de transcriptions, qui vont entraîner des changements d'expression des gènes de réponse aux stress (Xiang et al., 2002). Il existe plusieurs senseurs permettant la détection du stress, parmi eux : on trouve une protéine kinase transmembranaire, la protéine AtHK1 d'Arabidopsis fonctionnant comme un osmosenseur (Urao et al., 1999 ; Lui et al., 2001) et les récepteurs couplés aux protéines hétérotrimériques de type G situés sur la membrane plasmique (Virlouvet., 2010). Ces senseurs vont induire la production d'antioxydants et une série de phosphatases, activant des protéines impliquées dans la protection cellulaire ou leurs facteurs de transcriptions (Clavel et al., 2005 ; Beck et al., 2007).

Une fois perçus par leurs récepteurs spécifiques, les signaux de stress vont emprunter deux types de voies de transduction du signal, selon l'implication de l'ABA ou non (Chefdor., 2006 ; Zhang et al.2007). Bien que les deux voies soient fonctionnellement indépendantes, des interférences ne sont pas à exclure (Chavez et al., 2003).

### **3.5 .Les gènes et leurs produits induits en cas de stress hydrique**

Lors d'un stress hydrique, il existe un assortiment de gènes pouvant être exprimé ou réprimé ; les produits de ces gènes, exercent des fonctions dans la réponse et la tolérance des plantes au stress au niveau cellulaire (Wang et al., 2003 ; Cherian et al., 2006 ; Secenji et al., 2005 ; Schinozaki et al., 2003).

Selon des analyses transcriptomiques faites sur Arabidopsis et sur le riz, Yamaguchi Shinozaki et Schinozaki., (2007) ont réparti les produits des gènes induits en conditions de stress hydrique en deux groupes :

-Le 1<sup>er</sup> groupe : comporte des protéines dites fonctionnelles, exerçant une fonction dans la tolérance au stress, regroupant ainsi les protéines chaperonnes, les protéines LEA (déhydrines), les enzymes clés de la biosynthèse des osmolytes, les canaux à eau (aquaporines), les transporteurs de sucre et de proline, les enzymes de détoxification et diverses protéases.

-Le 2<sup>ème</sup> groupe : comprend les protéines dites de régulation. Ce sont généralement, des protéines impliquées dans la régulation de la transduction du signal et de l'expression des gènes de stress. Elles incluent les facteurs de transcriptions, les protéines kinases, les

protéines phosphatases, les enzymes impliquées dans le métabolisme des phospholipides, ainsi que d'autres molécules signales.

### 3.5.1 .Accumulation des osmolytes

Afin de se protéger contre un stress osmotique, les plantes synthétisent en grande quantité des solutés compatibles. Il s'agit de molécules hautement solubles, de faible poids moléculaire et non toxique, même à des concentrations cytosoliques élevées (Farooq *et al.*, 2001). Ils s'accumulent majoritairement dans le cytoplasme et n'interfèrent en aucune mesure avec le métabolisme normal. Leur principal rôle étant, de préserver la turgescence des cellules, en maintenant une osmolarité intracellulaire égale à l'osmolarité extracellulaire, évitant ainsi un efflux d'eau de la cellule (Hare *et al.*, 1998 ; Plessis., 2009 ). L'augmentation du potentiel osmotique peut s'accompagner d'une accumulation d'ions, les osmolytes vont alors assurer la stabilisation des protéines, la prévention de l'intégrité membranaire ainsi que l'élimination des radicaux libres (Chaves *et al.*, 2003 ; Christensen et Feldmann., 2007).

#### 3.5.1.1 .La proline

L'accumulation de la proline constitue un mécanisme de tolérance à la sécheresse (Bensalem *et al.*, 2005 ). Les teneurs en acides aminés libres augmentent significativement, chez de nombreuses espèces monocotylédones et dicotylédones, soumises à un stress hydrique (Dubos., 2001). La proline semble jouer un rôle particulièrement important. On lui attribue un rôle d'osmoticum au niveau cytosolique et vacuolaire, mais aussi, un rôle dans la régulation du potentiel redox. En plus, de protéger les membranes et les enzymes contre les perturbations conformationnelles causées par les ions (Cherian *et al.*, 2005 ; Anjum *et al.*, 2011).

#### 3.5.1.2. Les sucres

Outre, le fait que les sucres soient considérés comme les éléments carbonés primaires synthétisés et exportés dans toute la plante lors de la photosynthèse ; ils exercent également un rôle non énergétique d'osmorégulateur et d'osmoprotectant (Chaumeil., 2006). L'augmentation de la teneur de ces osmolytes (donc leur rôle) lors de la réponse au stress hydrique a été rapportée depuis longtemps chez de nombreuses espèces (Ingrams et Bartels., 1996 ; Najim., 2007). L'accumulation de sucres tels que le saccharose, le tréhalose, les hexoses et les oligosaccharides de la famille du raffinose et des polyols, est obtenue le plus souvent, par une hydrolyse accrue de l'amidon (Plessis., 2009).

Ces osmoticums participent eux aussi au maintien de la balance de la force osmotique, pour garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevé que possible. Ils permettent une préservation de l'intégrité membranaire et, en enveloppant les protéines, ils protègent ces dernières de la perte de leur conformation (Mathur et *al.*, 2008 ; Zerrad et *al.*, 2008). Selon Kameli et Losel., (1996) l'accumulation des sucres et d'autres solutés contribue, à l'ajustement osmotique au niveau des feuilles de blé en conditions de stress. Ils peuvent également lutter contre les effets des ROS et participer au phénomène de vitrification (Wang et *al.*, 2003). Lors d'une dessiccation sévère, une saturation en sucres entraîne une vitrification du cytoplasme de la cellule et évite une cristallisation des solutés, qui causerait des dommages cellulaires irréversibles (Chaumeil., 2006). Gray et *al.*, (2000), ont pu obtenir un riz transgénique sur-exprimant le tréhalose, tolérant de multiples stress abiotiques.

### 3.5.2. Les enzymes de détoxification

Les cellules stressées, au même titre que les cellules non stressées, produisent des composés oxydants, éliminés par le système de défense des plantes. Leur production et leur dégradation sont en équilibre, dans les cellules non stressées. L'une des conséquences des stress environnementaux, y compris le stress hydrique, est une augmentation de la quantité des espèces réactives de l'oxygène les ROS, qui endommagent les structures cellulaires par oxydation (Christensen et Feldmann., 2007 ; Zerrad et *al.*, 2008 ; Mathur et *al.*, 2008).

Afin de contrôler le niveau des ROS et protéger leurs cellules, les plantes ont développé un système de défense antioxydant crucial, pour le maintien de l'intégrité des systèmes photosynthétiques lors d'une contrainte hydrique. Parmi les enzymes du système antioxydant on peut citer : les superoxydes dismutases (SOD), les catalases (CAT), les glutathions peroxydases (GPX), les ascorbates peroxydases (APX) (Reddy et *al.*, 2004 ; Flexas et *al.*, 2006 ; Battagland., 2010).

### 3.5.3 .Les protéines LEA (*Late embryogenesis abundant*)

Les LEA sont des protéines ubiquitaires, s'accumulant très fortement pendant la phase tardive de la maturation des graines (d'où leur appellation), mais aussi dans les tissus végétatifs en réponse : à la déshydratation, aux basses températures, à la salinité et à l'application de l'ABA (Ramanjulu et Bartels., 2002 ; Hundertmark et Hinch., 2008 ; Boucher., 2009).

Depuis quelques années, plusieurs gènes codant pour les protéines LEA, ont été isolés chez le coton (Baker et *al.*, 1988; Galau et Close, 1992), le riz (Mundy et Chua, 1988), le blé (Litts et *al.*, 1987), l'orge (Close et *al.*, 1989) et le maïs (Vilardell et *al.*, 1990).

En plus d'être omniprésentes chez les plantes, ces protéines ont également été observées chez les bactéries et les animaux tels que les nématodes.

Initialement découvertes dans les graines de coton, les LEA peuvent être réparties en, au moins six groupes distincts, selon leur homologie de séquence et leur profil d'expression : groupe I (D19), groupe II (D11, *déhydrine*), groupe III (D7), groupe IV (D113), groupe V (D29), groupe VI (D34). Ces derniers sont souvent désignés par le nom de la première protéine LEA décrite au sein de ce même groupe (Wise., 2003 ; Goyal et *al.*, 2003). Selon des travaux plus récents (Jaspard et *al.*, 2012) elles peuvent être réparties en 12 classes, en fonction de leurs propriétés physicochimiques et en fonction des analyses statistiques de leur séquence en acide aminé.

Les protéines LEA sont généralement des protéines hydrophiles, non structurées à l'état natif (elles s'enrichissent en structures secondaires en conditions dénaturantes) et très résistantes à la chaleur (Wise et Tunnacliffe., 2007 ; Battaglia et *al.*, 2008).

Bien que ces protéines soient connues depuis longtemps (Dure et *al.*, 1981), leur fonction exacte demeure encore inconnue. Toutefois, un certain nombre de mécanismes ont été proposés tels que : la séquestration d'ions, la stabilisation des membranes et une activité anti-agrégation des protéines (Tunnacliffe et Wise., 2007, Mathur et *al.*, 2008).

### 3.5.4 .Les protéines MIP (Major Intrinsic proteins)

Alors que la bicouche lipidique détermine la structure de base des membranes biologiques, les protéines sont responsables de la plupart des fonctions biologiques. Les protéines membranaires peuvent être réparties en deux grandes catégories, en fonction de la nature de leur interaction avec la membrane : les protéines extrinsèques et les protéines intrinsèques (Dupont., 2011). Les protéines intrinsèques présentent au moins une partie de leur structure ancrée dans la membrane, leurs chaînes polypeptidiques peuvent traverser la bicouche lipidique une, à plusieurs fois. Les gènes codant ces protéines représentent environ 25% du génome (Stevens et *al.*, 2000), reflétant ainsi l'importance de cette classe de protéine.

Le passage aisé de l'eau à travers les membranes, a longtemps été considéré comme un phénomène de simple diffusion, à travers la bicouche lipidique, ce qui n'explique pas à lui seul, la grande perméabilité des biomembranes (Chaumont., 2010). La découverte des

protéines intramembranaires, les MIP (pour *Major Intrinsic Proteine*), a abouti à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires, responsables du transport transmembranaire chez les plantes (Maurel., 1997). La plupart des membres de la famille des MIP ont été identifiés en raison de leur abondance (Johanson et *al.*, 2000). Ces dernières constituent une large famille de protéines très répandue au sein des organismes vivants, qu'ils s'agissent de bactéries, de moisissures, de plantes ou d'animaux (Chaumont et *al.*, 2001).

Les MIP forment des canaux transmembranaires, assurant le transport passif de petites molécules polaires telles que : le glycérol, l'urée ou encore de l'eau. La perméabilité des membranes dépend de l'interaction protéine-membrane ou de la phosphorylation/déphosphorylation de ces dernières. Les MIP responsables du transport spécifique de l'eau sont nommées *Aquaporines* (Forrest., 2009).

### III-Les protéines déhydrines

#### 1 .Description des protéines déhydrines

Les protéines LEA de groupe 02, LEA- D11, RAB (*Responsive to ABA*) ou encore les déhydrines constituent les protéines LEA, les plus fréquemment décrites (Close., 1996 ; Rorat et *al.*, 2006 ; Melloul et *al.*, 1013). Elles représentent un groupe de protéines immunologiquement distinctes (Campbell et Close., 1997 ; Allagulova., 2003 ; Lopez et *al.*, 2003) qui s'accumulent typiquement : lors de la phase tardive de la maturation des graines, en présence de l'ABA ou encore, en réponse à n'importe quelle force de déshydratation, imposée par l'environnement (Scott., 2000 ; Ismail et *al.*, 1999 ; Rampino et *al.*, 2006 ; Battaglia et *al.*, 2008). Elles peuvent également s'accumuler à proximité des tissus végétatifs, en conditions de croissance optimale (Rorat et *al.*, 2004).

Chez les embryons immatures, ainsi que chez les graines de céréales stressées, le taux de déhydrines peut atteindre 1% de la totalité des protéines solubles (Close et *al.*, 1989 ; Ceccardi et *al.*, 1994).

Les déhydrines sont largement distribuées dans le règne végétal (Rampino et *al.*, 2006), décrites chez plus de 30 espèces diverses : dont le tournesol (Cellier et *al.*, 1998), l'orge (Zhu et *al.*, 2000) et le blé (Lopez et *al.*, 2003). Elles ont aussi été identifiées chez les lichens, les algues, les mousses et les cyanobactéries. (Rorat et *al.*, 2006 ; Beck et *al.*, 2007).

Ces protéines sont thermostables et maintiennent leur intégrité en solution aqueuse, à une température allant jusqu'à 95°C, ce qui pourrait être dû à la perte de structure rigide à l'état

natif (Campbell et Close., 1997 ; Allagulova et *al.*, 2003). L'agrégation induite par le chauffage est due à la dénaturation des protéines et à l'altération de leurs domaines hydrophobes. Les protéines qui comportent peu ou pas de domaines hydrophobes, ne s'agrègent donc pas (Jepson et Close., 1995, Svensson et *al.*, 2000).

Les DHNs sont constituées de motifs suffisamment uniformes pour être utilisés, comme base pour une annotation descriptive (la Sténographie YSK). Le segment K présent dans toutes les déhydrines du côté C-terminal (séquence hautement conservée) ; ainsi que le segment Y et le segment S (Goyal et *al.*, 2003 ; Tunnacliffe et Close., 2007). Les protéines DHNs présentent une grande diversité concernant le nombre et l'ordre de leur segment YSK ; la caractérisation biochimique de ses différentes formes, permettra la clarification de ces différences et la détermination de leur implication fonctionnelle.

### 2. Structure des protéines déhydrines

Les déhydrines sont caractérisées par un large éventail de masse molaire, qui varie de 9 KDa pour la déhydrine *Wsi727* du riz (Takahashi et *al.*, 1994) jusqu'à 200 KDa pour la déhydrine *Wcs200* du blé (Oullet et *al.*, 1993). Il s'agit de protéines hautement hydrophiles, en raison de leur composition riche en acides aminés chargés et en acides aminés polaires (Cambell et Close., 1997 ; Allagulova et *al.*, 2003 ; Battaglia et *al.*, 2008). Elles sont également caractérisées par : un manque en tryptophane, une faible quantité de cystéine (Rorat., 2006), un haut pourcentage en glycine (>20%) ainsi que l'absence de structure tridimensionnelle définie (Garay-Arroyo et *al.*, 2000 ; Tompa., 2006 ; Battaglia et *al.*, 2008).

Les DHNs font partie d'un ensemble plus large (Plus large que les protéines LEA) de protéines, dites 'intrinsèquement désordonnées' IDP (*Intrinsically Disorderd Protein*) avec lesquelles, elles partagent un certain nombre de caractéristiques (Boucher., 2009 ; Idilko., 2013). En effet, elles possèdent la faculté de pouvoir changer de conformation, en fonction des changements de leur microenvironnement ambiant. Un changement de conformation implique donc un changement de fonction (Brini et *al.*, 2011). Cette propriété emblématique des déhydrines, est due à leur faible proportion (voir absence) en structure secondaire (hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ ) et ce, en solution à l'état natif. A titre d'exemple : les déhydrines du maïs (Ceccardi et *al.*, 1994), de la plante de résurrection (Lisse et *al.*, 1996), du citronnier (Hara et *al.*, 2001) et d'*Arabidopsis* (Mouillon et *al.*, 2006). Toutefois, en présence de solvant tel que le trifluoroéthanol (*TEF*), de détergent anionique tel que le dodécylsulfate de sodium (*SDS*)



ou étant en contact avec des phospholipides, une petite fraction de la protéine est apte à former des structures en hélice  $\alpha$  (Mouillon et *al.*, 2006, Rorat., 2006). Ainsi Koag et *al.*, (2003) ont mis en évidence l'aptitude de la DHN1 à se structurer, une fois incubée avec des vésicules lipidiques acides. Ismail et *al.*, (1999) quant à eux ont mis en évidence l'aptitude d'une déhydrine d'asperge à adopter une conformation en hélice  $\alpha$  en présence de SDS. Une aptitude, qui reste également valable une fois exposées à un stress de déshydratation. Dure., (1993) fut le premier à noter la formation des hélices  $\alpha$ , au niveau de plusieurs protéines LEA. Cette hélice semble être analogue, voire similaire à des structures observées chez les apolipoprotéines du plasma sanguin. En raison de cette analogie, les déhydrines pourraient agir au niveau de l'interface phospholipidique membrane/cytosol des cellules végétales, ce qui permettrait, une fonction de protection des membranes. L'autre analogie concerne les protéines chaperonnes. De ce fait, les déhydrines pourraient agir afin de prévenir les agrégations protéine/protéine, lors du déclin de l'activité de l'eau cytoplasmique (Campbell et Close., 1997).

Les déhydrines se distinguent des autres protéines LEA, par la présence d'un segment hautement conservé : le segment K, elles possèdent entre autres, deux autres motifs fonctionnels : le segment S et le segment Y (Figure.2.).

### ***Le segment K***

Le segment K (EKKGIMDKIKELPG) est un motif conservé de 15 acides aminés riches en lysine, souvent présent du côté C-terminal. Il est généralement répété de 1 à 11 fois. Par définition, toutes les déhydrines possèdent au moins un segment K, associé à un nombre et une composition variable d'autres segments (Dure., 1993 ; Close., 1996). Des prédictions de structures indiquent une proportion à former des hélices  $\alpha$  amphiphiles, assurant une fonction chaperone-like, permettant la stabilisation des macromolécules (Close., 1996 ; Campbell et Close., 1997 ; Goyal et *al.*, 2005 ; Rorat et *al.*, 2006 ; Tunnacliffe et Wise., 2007 ; Battaglia et *al.*, 2008 ). La détection des déhydrines chez un grand nombre de plantes a pu se faire à l'aide d'anticorps, réagissant spécifiquement, avec cette séquence hautement conservée (Campbell et Close., 1997 ; Allagulova et *al.*, 2003).



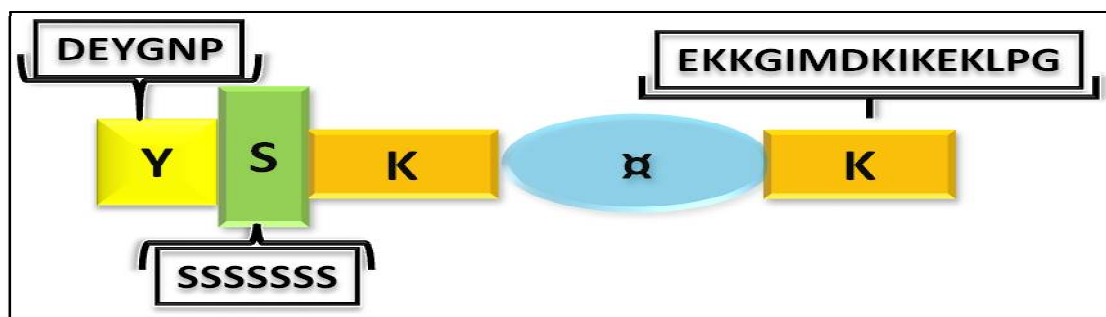
**Le segment S**

Le segment S (poly sérines, S<sub>n</sub>) comprend un grand nombre de résidus sérines et peut-être phosphorylé. La phosphorylation du segment S, permet de promouvoir l'interaction des déhydrines et des peptides signaux spécifiques, suivie de leur translocation jusqu'au noyau (Allagulova et al., 2003). Il peut être associé à une localisation nucléaire (Goday et al., 1994).

**Le segment Y**

Le segment Y (V/TDEYGNP): quand il est présent, il apparaît généralement en tandem en 1 à 35 copies du côté N-terminal de la protéine (Goyal et al., 2005 ; Rorat., 2006).

Il présente des homologues de séquence avec le site de liaison des nucléotides aux protéines chaperonnes des plantes (Close, 1996).



**Figure.2.** Représentation schématique d'une DHN (YSK<sub>2</sub>) de l'orge (Koag et al., 2003). Cette DHN affiche une combinaison des 3 segments YSK, avec 2 copies du segment K, entre lesquels se trouve un segment φ.

En plus de ces trois segments, les déhydrines peuvent contenir une région moins conservée, enrichie en Gly et en acides aminés polaires (en particulier en thréonine) : c'est le segment φ. Chez certaines DHNs, ce segment se situe entre les segments K. Le segment φ hautement polaire, forme des ponts hydrophobes avec les groupements polaires des macromolécules et peut ainsi, interagir avec les composants nucléaires et cytosoliques (Campbell et Close., 1997 ; Allagulova., 2003).

La structure, ainsi que la taille des déhydrines qui varie entre 82 et 575 acides aminés, est déterminée par le nombre et l'agencement des trois précédents motifs. Ce qui permet de répartir les déhydrines à leur tour en 06 sous-groupes : Y<sub>n</sub>SK<sub>2</sub>, SK<sub>2</sub>, K<sub>n</sub>, K<sub>n</sub>S, SK<sub>n</sub> et Y<sub>2</sub>K<sub>n</sub> (Puhakeinen et al., 2004 ; Dahanaraj et al., 2005 ; Goyal., 2005). Le plus représenté : est le sous-groupe Y<sub>n</sub>SK<sub>2</sub>, fréquemment impliqué dans la réponse à la déshydratation.

### 3. Gènes codant les protéines déhydrines, diversités et abondances

Actuellement, plus de 100 gènes DHNs ont été caractérisés à partir de différents *Angyosperme* et *Gymnosperme* (Close., 1996 ; Svensen et al., 2002). Typiquement, chaque espèce végétale possède la capacité de produire un nombre varié de déhydrines. On en dénombre 10 caractérisées chez l'arabette des dames, 13 chez l'orge, 8 chez le riz, 3 chez le peuplier et la vigne et au moins 2 chez d'autres espèces végétales (Hundertmark et Hincha., 2008). A titre d'exemple la DHN, Ha Dhn Z dont l'activité transcriptionnelle augmente significativement au niveau des lignées de tournesol tolérantes au stress, en comparaison avec les lignées sensibles. Mais aussi la DHN-5 du blé (Brini et al., 2007). Toutes les déhydrines ne sont pas systématiquement surexprimées en conditions de stress abiotique. Chez *Arabidopsis thaliana* il n'y a que 6 gènes sur 10 qui le sont (Hundertmark et Hincha., 2008).

L'expression des gènes déhydrines est dans la plupart des cas due à l'ABA, dont les concentrations *in vivo* augmentent au niveau des cellules végétales, en condition de déshydratation (Bray., 1994). Le rôle de l'ABA, dans le processus de résistance à différents stress environnementaux, est grandement établi, mais le rôle exact de ce dernier, dans l'expression des gènes DHNs demeure encore inconnu. Dans certains cas, l'augmentation de l'ABA ne constitue pas l'agent primaire qui permet l'expression des gènes DHNs, ce qui suggère qu'il existe des programmes de contrôle en chevauchement, qui peuvent être ABA dépendant ou ABA-indépendant (Campbell et Close., 1997 ; Zhang et al., 2000 ; Allagulova et al., 2003 ; Beck et al., 2007).

### 4. Localisation subcellulaire des protéines déhydrines

Etant ubiquitaires, les DHNs peuvent s'accumuler dans tous les compartiments cellulaires : le cytosol, le noyau, la mitochondrie, le chloroplaste, la vacuole, ainsi qu'au voisinage de la membrane plasmique (Tableau.1.) (Tunnacliffe et Wise., 2007; Battaglia et al., 2008).

Elles demeurent cependant, principalement localisées dans le cytoplasme et le noyau (Goday et al., 1994 ; Houde et al., 1995). Après 15 minutes d'incubation des graines de maïs en présence d'ABA, on note l'accumulation des déhydrines dans le cytoplasme. En prolongeant le traitement, elles sont détectées dans le noyau. Après 48h d'incubation, le niveau maximal d'accumulation est observé aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. Dans le noyau, les DHNs sont principalement associées à l'hétérochromatine et à l'euchromatine. Dans le cytoplasme, elles sont principalement localisées dans le milieu intracellulaire, avec une faible proportion dans les organelles (Allagulova et al., 2003).

La phosphorylation du segment S, a été associée avec la translocation de la DHN portant ce segment du cytosol au noyau. Ceci, a été démontré pour la RAB17 du maïs (Riera et al., 2004), la TAS14 de la tomate (Godoy et al., 1994) et la DHN-5 du blé (Brini et al., 2007).

Il n'en demeure pas moins, qu'une localisation nucléaire a également été rapportée pour des DHNs dépourvues de segment S telle que la WCS120 (Houde et al., 1995; Wisniewski et al., 1999). De plus, d'autres déhydrines pourvues d'un segment S, sont localisées uniquement au niveau du cytosol, telle que la RAB21 du riz et la DSP16 de la plante de résurrection (Mundy et Chua., 1988 ; Mitwisha et al., 1998).

**Tableau.1.** Localisation subcellulaire des protéines LEA-2 étudiées (Tunnacliffe et Wise, 2007).

Nom de la protéine	Espèces	Localisation subcellulaire	Référence
DHN1	Mais	Noyau /cytoplasme	Goday et al. 1994
DHR18_	Arabidopsis	Noyau/cytoplasme	Nylander et al. 2001
COR47	Arabidopsis	Noyau/cytoplasme	SUBA At1g20440
COR15A	Arabidopsis	Chloroplaste	Lin et Tomashow 1992
CuCOR19	Citronnier	Mitochondrie	Hara et al. 2003
TAS14	Pomme de terre	Noyau/cytoplasme	Goday et al. 1994
DHN21	Riz	Cytoplasme	Mundy et chua 1988
CS120	Blé	Noyau/cytoplasme	Houde et al. 1995
CO410	Blé	Membrane plasmique	Danyluk et al. 1998
WSC	Blé	Chloroplaste	Ndong et al., 2002
DHN-5	Blé	Noyau/cytoplasme	Brini et al. 2007a
LEA13	Cotonnier	Cytoplasme	Roberts et al. 1993
VCaB45B <sup>b</sup>	Céleri	Vacuole	Heyen et al. 2002

## 5 .Rôles fonctionnels des protéines déhydrines

Le fonctionnement moléculaire des protéines D11, n'est toujours pas clairement élucidé. Toutes fois, leurs propriétés physicochimiques indiquent, qu'elles ne catalysent pas de réactions métaboliques (Close et Chandler., 1990 ; Beck et al., 2007 ; Tomasini et al., 2008). Plusieurs travaux ont révélé une corrélation positive entre l'accumulation des transcrits ou des protéines DHNs, avec la tolérance aux stress par le froid, la sécheresse et la salinité (Lang et

Palva., 1992 ; Houde et *al.*, 1995 ; Sarhan et *al.*, 1997 ; Danyluk et *al.*, 1998 ; Zhu., 2000 ; Nylander et *al.*, 2001 ; Rorat, 2006 ; Brini et *al.*, 2007).

Le haut degré de conservation, de la séquence en acides aminés des DHNs entre les espèces, ainsi que leur induction en réponse aux stress abiotiques, pourraient leur suggérer un rôle dans la prévention contre les dommages cellulaires causés par la déshydratation (Close et Chandler., 1990).

Des fonctions spécifiques peuvent être attribuées aux DHNs, selon leur localisation subcellulaire. Etant principalement localisées dans le cytoplasme et le noyau, elles peuvent donc tout aussi bien, être associées à la chromatine qu'aux membranes.

Lorsqu'on examine les données d'un point de vue globale il semble plausible, que les déhydrines interagissent avec des surfaces présumées hydrophobes, plutôt qu'avec une classe spécifique de macromolécules (Campbell et Close., 1997).

Une localisation nucléaire peut être associée, à un rôle de stabilisation de la machinerie transcriptionnelle en condition défavorable. Les mécanismes entraînant la translocation de ces dernières jusqu'au noyau, bien que clairement démontré pour certaines DHNs (WCS 120 du blé, la RAB17 du maïs et la TAS14 de la tomate) restent encore à établir (Allagulova et *al.*, 2003). Certaines évidences tendent à suggérer que le segment S est impliqué dans ce processus, cela étant, ce n'est pas toujours le cas.

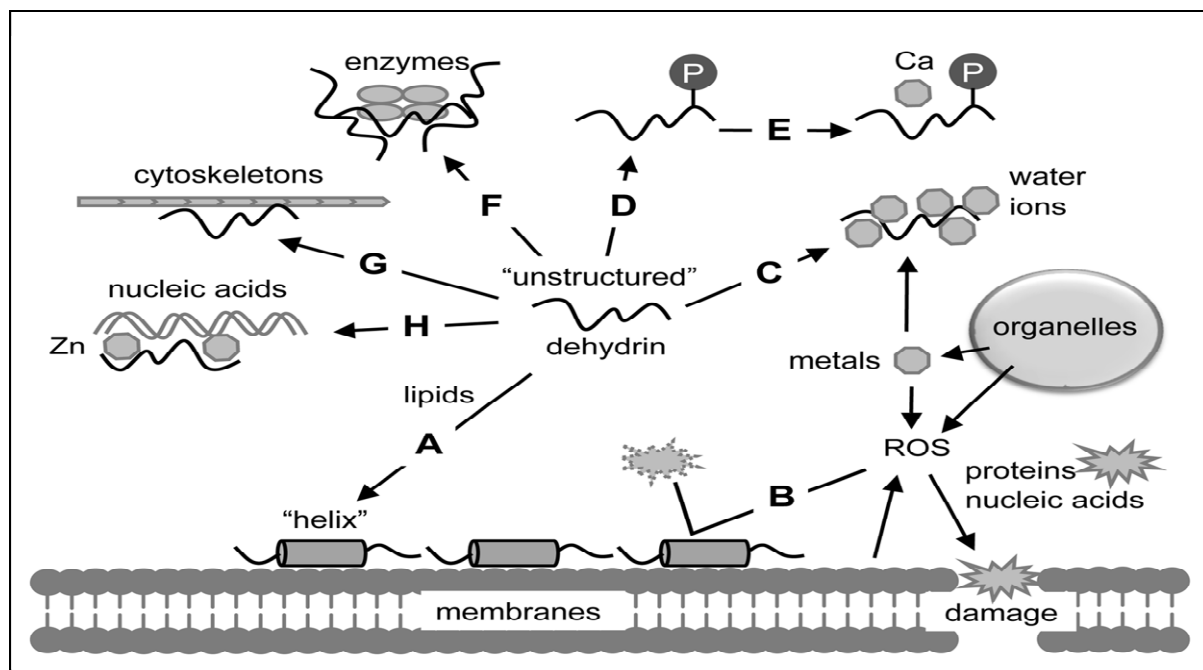
L'association des DHNs aux membranes, suppose leur implication dans la stabilisation des structures membranaires (Tommasini et *al.*, 2008). La formation de structure en hélice  $\alpha$ , au niveau du segment K (suite au séchage) permet aux DHNs d'interagir avec les composants lipidiques des biomembranes, ainsi qu'avec les sites hydrophobes des protéines partiellement dénaturées (Tollter., 2007). Cette fonction de stabilisation et d'interaction avec les membranes a pu être démontrée par Danyluck et *al.*, (1998) pour la WCOR410 du blé et par Koag et *al.*, (2003) pour la DHN1 du maïs. Ces protéines peuvent également interagir avec des molécules solubles, de faible poids moléculaire du cytoplasme, grâce à l'action combinée du segment K et du segment  $\phi$  (Ingram et Bartel., 1996 ; Ismail et *al.*, 1999 ; Rorat., 2006).

Les DHNs possèdent aussi la capacité de protéger des enzymes telles que : la Lactate déshydrogénase (LDH), la malate déshydrogénase, la fumarase et la citrate synthase (SC) contre l'action délétère de la dessiccation (Sanchez-Ballesta et *al.*, 2004 ; Grelet et *al.*, 2005 ; Reyes et *al.*, 2005 ; Hanin et *al.*, 2011).

Globalement, il a été proposé que ces LEA -2 seraient capables de maintenir la structure des macromolécules, en maintenant un niveau d'hydratation minimal autour de celle-ci, empêchant ainsi leur dénaturation et un changement dans leur conformation (Hoekstra et *al.*, 2002). Une autre hypothèse de fonctionnement serait, qu'elles agissent par encombrement stérique en formant un bouclier moléculaire, qui empêcherait l'agrégation des protéines (Boucher., 2009). Une action synergique avec les sucres pourrait renforcer cet effet anti-agrégation (Goyal et *al.*, 2005).

Lorsque les plantes subissent un stress violent, les composés cellulaires ont tendance à se cristalliser, provoquant de nombreux dommages cellulaires. Ce phénomène peut être contrecarré par les DHNs, qui peuvent agir comme des solutés compatibles, afin d'augmenter la viscosité du milieu intracellulaire, et ainsi éviter sa cristallisation (Dubos., 2001). L'intégrité des structures cytoplasmiques pourrait alors être maintenue au cours d'un déficit hydrique (Hara et *al.*, 2003).

Certaines études font également référence à leur implication dans des processus de détoxification d'ions et d'élimination de radicaux hydroxyles (Rorat., 2006). Compte tenu de leur forte teneur en acides aminés chargés, il a été émis l'hypothèse selon laquelle, les DHNs pourraient avoir la faculté de piéger (séquestrer) les ions s'accumulant dans le cytoplasme (Dure., 1993 ; Danyluck et *al.*, 1998 ; Wise et Tunnacliffe., 2003 ; Tompa et *al.*, 2006). Plusieurs déhydrines possèdent une aptitude à fixer (après phosphorylation) des ions comme le :  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  (Heyen et *al.*, 2002). De plus, conformément à Hara et *al.*, (2009) en présence d'ions Zn, ces protéines peuvent se lier à l'ADN. Ce qui implique qu'elles possèdent la faculté de mobiliser les ions, afin d'en atténuer les effets néfastes mais pas uniquement. Concernant le stress oxydatif, les DHNs semblent agir soit directement en éliminant les espèces réactives oxygènes (ROS), soit indirectement en séquestrant les ions ferreux et ferriques qui à faible concentration augmentent les risques de formation des ROS (Tollter., 2007 ; Boucher., 2009).



**Figure.3. :** Fonctions des déhydrines en relation avec les données expérimentales. Les fonctions sont représentées de A →H. A, liaison aux phospholipides ; B, piègeur des radicaux; E, liaison au calcium; C, la liaison à l'eau et des ions; D, F phosphorylation, la protection des enzymes; G, la liaison à cytosquelettes; H, la liaison aux acides nucléique. Certains déhydrines n'ont pas toutes les fonctions indiquées dans le schéma (Hara., 2010).

Le rôle de protection contre le stress, a également été mis en évidence par des travaux de génétique quantitative. Ainsi, chez l'orge et le soja des gènes DHNs ont été colocalisés avec des QTLs correspondant à des traits phénotypiques liés, à la tolérance au stress hydrique et hivernal (Campbel et Close., 1997), mais également par transgénèse. Des plantes transgéniques de tabac surexprimant le gène RAB 16A d'une variété de riz, sont plus tolérantes à la sécheresse et à la salinité (Roy Choudhury et Basu., 2007). Conformément à ces observations, Cheng et *al.* (2002) ont montré que la surexpression du gène PMA80 du blé améliore la tolérance aux stress salin et hydrique chez le riz.

Les DHNs possèdent une grande diversité structurale et fonctionnelle, qui semble être en adéquation avec leur grande diversité au sein de la plante. Certaines de ces fonctions sont communes à de nombreuses DHNs, alors que d'autres sont plus spécifiques (Figure.3.) (Hara et *al.*, 2010).

## 6 .Bases de données

Il existe plusieurs bases de données protéiques que l'on peut consulter à cet effet. La base de données *Uniprot KB* (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) qui attribue, à chaque protéine

répertoriée un identifiant unique (Id Uniprot), reconnu par plusieurs outils bioinformatiques. Le *NCBI*, permettant d'effectuer des requêtes assez complètes, ce qui assure un bon filtrage des protéines. Ou encore, une base de données uniquement consacrée aux protéines LEA, la *LEA-DB*, présentant plusieurs fonctionnalités dont la comparaison des caractéristiques des protéines sélectionnées. On peut y effectuer une recherche grâce à : un mot-clé, l'organisme au niveau duquel elles ont été découvertes, leur taille en acide aminé, par groupe de classification de Wise, par numéro d'accèsion *Pfam*, ainsi que par numéro d'accèsion CDD (domaines conservés). Certaines données sont disponibles à tout utilisateur, d'autres sont réservées à ceux disposant d'un mot de passe (Chatelain., 2007). Les données concernant les déhydrines, peuvent être obtenues en ayant recours à la base de donnée *LEA-DB*.

### 7. La déhydrine DHN-5 du blé dur

La déhydrine DHN-5 a été isolée et caractérisée chez le blé par Brini et *al.*, (2007). Présentant un haut degré de similarité avec les protéines LEA, RAB et déhydrines ; sa séquence la place dans le groupe des protéines LEA-D11.

La DHN-5 est une protéine de 227 acides aminés. Elle est caractérisée par un domaine hautement conservé, riche en lysine, le segment K. Ce segment est répété deux fois. Un segment S composé de 8 à 10 serines, ainsi qu'un segment Y, localisé en position N-terminal de la protéine. Deux copies du gène DHN-5 seraient localisées au niveau du chromosome 6AL et 6BL. Une forte accumulation des transcrits DHN-5 a été observée dans les embryons matures de graines de blé, alors que dans les tissus en germination traités par l'ABA ou par le NaCl, cette accumulation est moins importante et disparaît complètement dans les tissus germés et non traités. Moyennant une fusion avec la GFP, les observations au microscope confocal ont montré que la DHN-5 est présente dans le cytoplasme, alors qu'une large proportion de cette dernière est localisée au niveau du noyau (Brini et *al.* 2007).

## IV-Les protéines aquaporines

### 1. Description des protéines aquaporines

Les plantes se doivent de maintenir leur statut hydrique, tout au long de leur développement, même lorsque les conditions environnementales sont sévères (Maurel., 2009). L'absorption de l'eau se fait au niveau moléculaire grâce aux aquaporines ; des transporteurs membranaires passifs qui facilitent le transfert bidirectionnel de l'eau et de certains solutés à travers les membranes (Chrispeel et *al.*, 1999 ; Sakurai et *al.*, 2008 ; Merret., 2010).



Les aquaporines appartiennent à la large famille des protéines intramembranaires les MIPs, *Major Intrinsic Proteins* (Chrispeel et Maurel., 1994 ; Santos et Mazzafera., 2013).

Ces protéines hautement antigéniques (Chrispeels et *al.*, 1999) ont été identifiées chez presque tous les organismes vivants (Maurel et Chrispeel., 2001). Chez les végétaux, elles ont été identifiées dans le tonoplaste (Hofte et *al.*, 1992), dans la membrane plasmique (Kammerloher et Schaffner., 1993) mais aussi dans des nodules fixateurs d'azote (Johanson et *al.*, 2000) et dans le réticulum endoplasmique (Johanson et Gustavsson., 2002).

En se basant sur leur homologie de séquence, elles peuvent être divisées en quatre classes (Maurel et *al.*, 2008, Almeida-Rodriguez et *al.*, 2010). Les deux plus importantes sont : les PIPs pour *Plasmique Intrinsic Proteins* et les TIPs pour *Tonoplast Intrinsic Proteins*. Les PIPs sont à leur tour divisées en 2 sous groupes : PIP1 et PIP2 ; les PIP1 sont caractérisées par une plus longue extrémité N-terminal alors que les PIP2 sont caractérisées par une plus longue extrémité C-terminal. La 3<sup>ème</sup> classe comporte les NIPs, *Noduline26-Like Intrinsic Proteins*, caractérisées pour la première fois dans les nodules fixateurs d'azote des légumineuses et la 4<sup>ème</sup> classe comprend, les SIPs, *Small Intrinsic Proteins*. (Fotiadis et *al.*, 2000 ; Luu et Maurel., 2005 ; Maurel., 2007 ; Fouquet et *al.*, 2008). Lors des études d'annotation faites sur la mousse modèle *Physcomitrella patens*, d'autres classes d'aquaporines ont été répertoriées, celles des GIPs pour *GlpF-Like Intrinsic Proteins*, des HIPs pour *Hybrid Intrinsic Proteins* et des XIPs pour *Uncategorized x Intrinsic Proteins* (Danielson et Johanson., 2008).

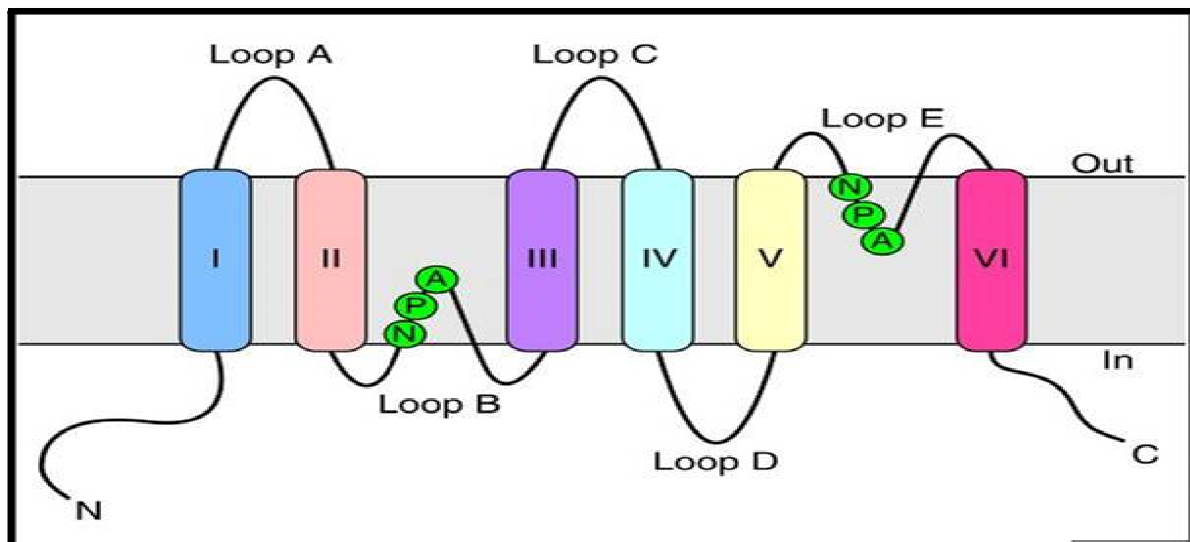
### 2. Structure des protéines aquaporines

Les aquaporines sont de petites protéines monomériques, hydrophobes de 250 à 300 AA et de 26 à 30 KDa formant un canal dans les membranes plasmiques ou les membranes intracellulaires (Merret., 2010 ; Forrest et Bhav., 2008 ; Chaumont., 2001 ; Tyerman et *al.*, 1999, Maurel et *al.*, 2007). Cette superfamille de protéines semble avoir évolué très tôt au cours de l'évolution, elle a été identifiée aussi bien chez les plantes, les humains, les levures, les bactéries et les archéobactéries.

Leur séquence en acide aminé est hautement conservée (Smith et Bhav., 2008). La plupart des AQPs présentent une séquence caractéristique, contenant 2 copies d'une séquence dite 'signature', la NPA box et 6 domaines transmembranaires en hélice  $\alpha$ , délimitant un port central permettant le passage de l'eau, à travers la bicouche lipidique. Cette structure conservée comportant 3 domaines intracellulaires et 3 domaines extracellulaires, est reliée par



cinq boucles (A-E) dont trois sont extracellulaires (A-C-E) (Maurel., 2007 ; Maurel et *al.*, 2008 ; Chaumont et Tyerman., 2014). Les boucles B et E présentent chacune un motif conservé Asparagine-Proline-Alanine (NPA Box). Les deux asparginines du motif semblent jouer un rôle dans la reconnaissance et la sélection des molécules d'eau (Chaumont et *al.*, 2005 ; Katsuhora.,2008). Ces deux motifs se trouvent de part et d'autre de la membrane : le premier motif NPA se trouve vers l'intérieur dans la première moitié de la protéine, tandis que le second se trouve vers l'extérieur dans la seconde moitié. Ces deux boucles sont hydrophobes et sont toutes deux enchâssées dans la membrane grâce au repliement des boucles (Kruse et *al.*, 2006 ; Maurel., 2007). Les extrémités aminiques (NH<sub>2</sub>) et carboxyliques (COOH) sont toutes deux exposées au cytosol (Chrispeel et Maurel., 1994). Cette répartition génère une symétrie interne, dans la mesure où la protéine AQP est structurée en deux moitiés, chacune comprenant trois domaines transmembranaires et une boucle hydrophobe avec son motif NPA. (Chrispeel et Maurel., 1994 ; Tayerman., 2002 ; Maurel., 2007 ; Forrest., 2008). Cet agencement provoque la formation d'un pore en forme de sablier qui est responsable du passage des molécules à travers la membrane (Di-Pietro., 2011) (Figure.4. et figure.5.).

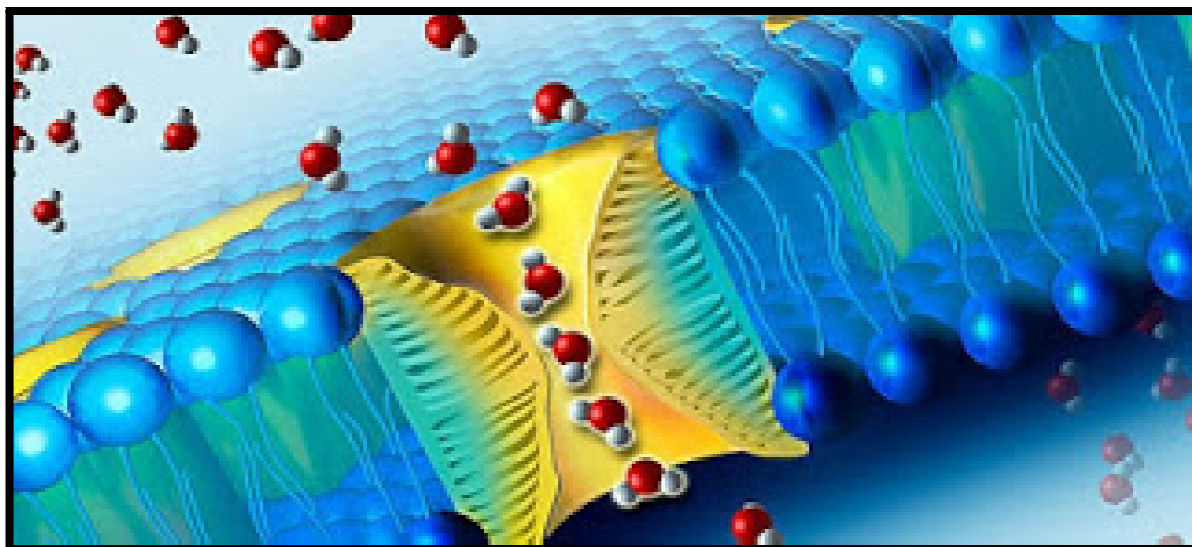


**Figure.4.** Topologie d'une aquaporine à travers la membrane. Les 6 domaines transmembranaires (I-VI) sont reliés par 5 boucles (A-E), les boucles B et E contiennent des motifs conservés NPA (Kruse et *al.*, 2006).

La caractérisation moléculaire de la structure des aquaporines a permis de montrer qu'elles sont organisées en tétramère, résultant d'interaction hydrophobe entre monomères et chaque monomère forme un pore indépendant (Chaumont et *al.*, 2005 ; Luu et Maurel., 2005 ;

Mahdieh et *al.*, 2008 ; Sauguier., 2009). La formation des tétramères est importante pour le repliement, la stabilité et ou la localisation des aquaporines (Johansen et *al.*, 2000).

Le transport des molécules d'eau se fait en file unique à travers le centre du pore, toute molécule plus grosse est exclue. Leur sélectivité peut s'expliquer par différents mécanismes incluant celui de l'exclusion de taille (Baaziz., 2011 ; Di-Pietro., 2011). Des analyses de modélisation de la structure des pores montrent que les PIPs possèdent un pore étroit typique d'un transport de l'eau, alors que d'autres AQPs végétales présentent une spécificité à des substrats plus gros tels que : le glycérol, l'urée, le formamide ou encore l'acide borique, l'acide lactique ou l'acide silicique (Maurel., 2007 ; Maurel et *al.*, 2008 ; Forrest et Bhav., 2010 ; Di-Pietro., 2011). D'autres analyses rapportent également une possibilité de transport du CO<sub>2</sub> (Mori et *al.*, 2014).



**Figure.5.** Modèle d'une AQP en forme de sablier. Les cercles rouges représentent les molécules d'eau traversant du vestibule extracellulaire au vestibule cytoplasmique à travers un canal étroit (Cohen., 2012).

### 3. Gènes codant les protéines aquaporines, diversités et abondances

Contrairement aux humains et aux souris, ne possédant que 10 AQPs (répartis en deux groupes), les AQPs végétales présentent une plus grande diversité. Une diversité pouvant être représentative, d'une large gamme de fonctions et d'une plus grande sélectivité (Tyerman et *al.*, 2002). Chez le maïs on en compte 36 (dont 14 PIPs), 33 chez le riz (Sakurai et *al.*, 2007) et 28 chez la vigne (Fouquet et *al.*, 2008). Chez *Arabidopsis* on en dénombre 35, dont 13 PIPs, prédominantes au niveau de la membrane plasmique, 10 TIPs dont certaines sont

localisées au niveau des vacuoles lactiques ou des vacuoles de stockage, 9 NIPs localisées au niveau du réticulum endoplasmique ou de la membrane plasmique et 3 SIPs au niveau du réticulum endoplasmique (Di-Pietro., 2011). Chez le blé, 24 gènes PIPs et 11 gènes TIPs ont été identifiés via des études *in silico* (Forrest et Bhave., 2008).

Les gènes MIPs d'*Arabidopsis* présentent des positions d'introns, hautement conservées et distinctes (les quatre sous-familles présentant la même caractéristique). Dans le cas des gènes PIPs, les trois introns sont localisés dans une position nucléotidique, très exactement conservée, avec une exception pour l'AQP AtPIP2 ; 4 dont la position du second intron est changée (elle est similaire à celle des TIPs) (Baiges., 2002).

Au niveau de la plante entière, les aquaporines ont un profil d'expression complexe, certaines étant exprimées dans tous les organes, d'autres le sont spécifiquement dans certains tissus, à certains stades de développement ou en réponse à des stimuli extérieurs (Maurel et *al.*, 2008).

#### **4. Localisation subcellulaire des protéines aquaporines**

Les aquaporines sont présentes dans toutes les membranes, des différents compartiments subcellulaires. Cette large distribution est le reflet d'une grande compartimentation cellulaire. Les noms attribués aux différentes classes d'aquaporines, laissent entendre que leur localisation est univoque et spécifique à la membrane d'un compartiment donné. Toutefois, les différentes classes ne sont pas nécessairement adressées à un compartiment subcellulaire unique (Merret., 2010). Comme précédemment mentionné, les PIPs sont localisés au niveau de la membrane plasmique, les TIPs au niveau des membranes vacuolaires. Les NIPs sont les homologues les plus proches de la GmNOD26, une AQP abondamment exprimée au niveau de la membrane pér bactéroïde des racines fixatrices d'azote du soja. Les NIPs sont aussi présents chez les non légumineuses, elles sont alors localisées au niveau de la membrane plasmique ou bien au niveau des membranes intracellulaires. Quant aux SIPs, cette petite classe d'aquaporines est principalement localisée au niveau du réticulum endoplasmique (Maurel., 2007). Seule la localisation de quelques TIPs et PIPs a été prouvée de manière formelle via des études biochimiques et immunocytochimiques, certains membres ont été nommés uniquement en fonction d'homologie de séquence. De ce fait, certaines investigations ont mis en évidence des TIPs détectés au niveau de la membrane plasmique et des PIPs détectés dans des membranes autres que la membrane plasmique (Baiges et *al.*, 2002).

De plus, cette compartimentation peut être poussée à une autre échelle. Des études immunocytochimiques ont montré que les types distincts de vacuoles coexistant au sein d'une même cellule sont équipés de combinaisons spécifiques d'isoformes TIPs. Les isoformes TIP1 et TIP2 sont préférentiellement associés aux larges vacuoles lytiques et aux vacuoles accumulant les protéines de réserves végétales respectivement (Jauh et *al.*, 1999 ; Maurel et *al.*, 2008).

La localisation génomique des gènes PIPs et TIPs du blé a été prédite suite à des études comparatives Riz-Blé ainsi qu'à divers approches *in silico*. Les cartes physiques placent ces gènes sur les chromosomes 2B, 2D, 6B et 7B (Forrest et Bhave., 2010).

### 5. Rôles fonctionnels des protéines aquaporines

Les végétaux sont soumis à des phénomènes de transpiration intenses. Dans des conditions optimums l'eau ainsi perdue, est remplacée par l'absorption racinaire. La découverte, tout comme l'étude de la fonction des aquaporines ont permis d'appréhender la régulation du statut hydrique des plantes (Postaire et *al.*, 2007).

Les aquaporines expliquent la plus au moins grande perméabilité des membranes cellulaires biologiques à l'eau (Chaumont., 2001).

Les aquaporines, PIPs, TIPs, NIPs et SIPs, fonctionnent comme des canaux à eau ; le transport de l'eau à travers le pore est passif. Toute fois certaines isoformes d'AQPs végétales ne sont pas spécifiques au transport de l'eau (qui demeure leur fonction principale) et peuvent tout aussi bien transporter de petits solutés tels que : le glycérol, l'urée, l'acide borique, l'acide silicique, l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et les espèces réactifs d'oxygènes (ROS) (Heinen et *al.*, 2009 ; Merret., 2010).

Les AQPs de la membrane plasmique et de la membrane vacuolaire (en association avec les transporteurs d'ions et d'autres solutés) sont cruciales pour le maintien de l'osmolarité cytosolique. On suppose que ces dernières joueraient un rôle essentiel dans plusieurs processus physiologiques, étant localisées dans la majorité des organes de la plante. Elles interviendraient de ce fait dans les mécanismes : d'expansions cellulaires, de croissances et de développements (Johansson et *al.*, 2000, Merret., 2010) . A titre d'exemple, il a été démontré chez le maïs que tous les gènes ZmPIPs (à l'exception du gène ZmPIP2;7) sont exprimés au niveau des feuilles. Une expression qui dépend du stade de développement du tissu foliaire. L'expression des gènes ZmPIPs augmente au niveau de la périphérie de la zone d'élongation foliaire, alors qu'elle diminue au niveau des tissus matures (Hachez et *al.*, 2008). Chez

*Arabidopsis thaliana*, les plantes dont l'expression de l'AtPIP1;2 a été diminuée, présentent une masse racinaire plus importante. Cette modification entraîne une augmentation de la surface racinaire, qui permettrait aux plantes de prélever la même quantité d'eau que les plantes sauvages exprimant cette AQP (Postaire et *al.*, 2010). Les études de l'expression des gènes ou plus précisément celles de l'abondance des transcrits mRNA ont conduit aux conclusions suivantes : I) la majorité des aquaporines sont hautement exprimées au niveau des tissus vasculaires, II) quelques aquaporines TIPs sont hautement exprimées au niveau des méristèmes et III) les aquaporines sont hautement exprimées dans les tissus sujets à un haut influx en eau et en métabolites (Chrispeel et *al.*, 1999).

Plus intéressant encore, les aquaporines peuvent intervenir dans la réponse des plantes à divers stress biotiques et abiotiques (Maurel et Chrispeel., 2001). Les stimuli environnementaux incluant, la sécheresse (Kawasaki et *al.*, 2001), la salinité (Yamada et *al.*, 1995), l'augmentation des niveaux d'ABA, le rythme circadien ainsi qu'un stress nutritionnel peuvent réguler l'expression des PIPs et des TIPs au niveau des transcrits (Vera-Estrella et *al.*, 2004). Mais aussi au niveau protéique (Kirch et *al.*, 2000).

Chez *Pisum sativum*, Guerrero et *al.*, (1993) ont rapporté l'existence d'une régulation positive d'un certain nombre de PIPs au niveau des feuilles stressées. Une observation similaire a été rapportée pour un bon nombre de gènes PIPs chez différentes espèces (Yamaguchi-shinozaki et *al.*, 1992 ; Fray et *al.*, 1994 ; Yamada et *al.*, 1997). Toutefois, certains gènes PIPs peuvent également être sous-exprimés en conditions de stress hydrique. Une observation communément rapportée chez *Arabidopsis*, à l'exception des gènes : AtPIP1; 4 et AtPIP2; 5 qui sont plutôt surexprimés (Alexenderson., 2005).

L'implication des gènes AQPs dans la réponse à la sécheresse constitue une évidence incontestée, toutefois une interprétation causale de cette implication est plus difficile à établir et ce pour diverses raisons :

- Les bibliothèques d'ADNc utilisées pour l'étude de l'expression différentielle des gènes sont obtenues d'extraits provenant de la plante entière. Ceci rend impossible la localisation d'un gène AQP exprimé spécifiquement dans un tissu donné (Tyerman et *al.*, 2002). Il arrive que seules certaines cellules d'un tissu donné, présentent une surexpression de gènes AQPs (Kirch et *al.*, 2000).

- Une localisation subcellulaire non prouvée des transcrits décrits (Tyerman et *al.*, 2002).

- La difficulté d'établir une comparaison directe entre les résultats des différentes expérimentations, en raison des différences méthodologiques d'induction du stress hydrique

(application de mannitol, restriction en eau ou exposition des racines à l'air) ou à cause des tissus et des espèces étudiées (Smith et Bhav., 2008).

Toutefois, la modulation de l'expression des gènes aquaporines en réponse à divers stress de déshydratation, appuie leur implication présumée dans la tolérance au stress hydrique et salin (Maurel et al., 1997).

### **6. L'aquaporine PIP2**

Les PIPs constituent la plus large classe de protéines aquaporines, c'est celle qui en compte le plus de membres. Cette classe d'AQPs peut être répartie en deux sous-groupes : PIP1 et PIP2, partageant un haut degré de conservation et d'homologie (Li et al., 2011).

En règle générale, les PIP2 possèdent une extrémité N-terminal plus courte et une extrémité C-terminal plus longue, de plus elles possèdent une portion additionnelle de 4 à 10 acides aminés au niveau de la première boucle extra-cytosolique (Otto et Kaldenoff., 2006).

La TdPIP1;1 est inactive pour le transport de l'eau, lorsqu'elle est exprimée seule dans l'oocyte de xénope (système d'expression hétérologue) alors que la TdPIP2;1 y est active en tant que canal transporteur d'eau (Ayadi et al., 2011). En se basant sur les études faites sur des systèmes d'expression hétérologues, les PIP2 ont la capacité d'augmenter la perméabilité à l'eau de 5 à 20 fois plus, en comparaison aux valeurs contrôles (Weig et al., 1997).

A ce jour, plusieurs membres de ce sous-groupe ont été fonctionnellement caractérisés, ces protéines peuvent être impliquées dans le transport cellulaire de l'eau au niveau des racines, des feuilles, des organes de reproduction et des graines en germination. Par conséquent, elles ont été localisées dans tous les organes de la plante (Lopez et al., 2003 ; Bots et al., 2005).

En raison de la grande perméabilité à l'eau rapportée par plusieurs auteurs, les isoformes PIP2 pourraient jouer un rôle majeur dans les voies symplastiques et apoplastiques de transport de l'eau. En faisant appel à différents mécanismes de régulation, les AQPs peuvent exercer un contrôle fin de la conductivité hydraulique de la voie cellule-cellule en réponse aux stress biotiques et abiotiques (Kaldenoff et Fischer., 2006).

### **V-Etude des mécanismes moléculaires de réponse au stress**

D'un point de vue pratique, l'étude des mécanismes moléculaires de réponse au stress hydrique, consiste à induire un stress sur une plante entière et à en suivre les modifications au niveau génomique. Il est possible, d'analyser à plusieurs niveaux, les modifications du génome, intervenant au cours d'un stress. Elles peuvent avoir lieu au cours de la transcription, de la traduction ou lors des phases post-traductionnelles. Les techniques de biologie

moléculaire permettent de séparer et de repérer, aussi bien les protéines que les transcrits nouvellement exprimés ou réprimés (Monneveux et This., 1997).

L'ensemble des processus biologiques est régi par un assortiment de gènes, dont l'expression est strictement régulée et détermine le devenir de la cellule, ou de manière plus globale de tout organisme vivant. L'altération de cette expression constitue donc l'objet de plusieurs investigations, dans la mesure où les produits de ces gènes, sont directement impliqués dans l'adaptation des plantes à leur environnement. La première étape de l'expression d'un gène, sujette à ce contrôle strict, la transcription. Elle constitue le premier niveau d'intégration entre les facteurs environnementaux et le génome (Michaut., 2008). Bien que l'activité finale d'un gène s'illustre au niveau protéique, les ARN messagers synthétisés fournissent une base pour l'adaptation de la cellule, à son environnement via la synthèse des protéines. L'étude d'expression au niveau transcriptomique (ARN) constitue donc une approche intéressante, pour comprendre toute modification de l'activité cellulaire (Mele et Hake., 2003).

Les techniques d'étude du transcriptome sont très largement utilisées et connaissent depuis une vingtaine d'années un essor impressionnant. Ces techniques bien que très variées, sont fondées sur un même principe : l'identification dans une population donnée d'ARN, d'un transcrit ou d'une population de transcrits dans le niveau d'abondance varie par rapport à une autre population (Merdinoglu., 2008). Le choix entre ces différentes techniques, repose sur l'objectif de départ selon que l'on vise une étude ciblée d'un ou de quelques dizaines de gènes ; ou alors une étude focalisée, sur l'identification de l'ensemble des gènes, dont l'expression diffère entre différents échantillons expérimentaux. La première approche implique généralement une connaissance a priori des gènes étudiés, la seconde fait appel à un système d'analyse plus globale (Moody., 2001 ; Chaumeil., 2006).

L'approche RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction) a été grandement utilisée, dans les analyses du transcriptome publiées jusque-là, en particulier pour mesurer le niveau d'expression d'un gène (Gutierrez et *al.*, 2008). Elle peut être semi-quantitative (SQ)-RT-PCR ou quantitative Q-RT-PCR (Choquer et *al.*, 2003). C'est une technique hautement sensible, qui permet la détection des transcrits même faiblement exprimés, dans l'intervalle du picogramme. Elle peut donc être employée, afin d'analyser des variations d'expression mêmes discrètes. Il s'agit aussi d'une procédure hautement spécifique, et n'est donc pas utilisée pour mesurer l'expression d'un ensemble de gènes simultanément (Freeman et *al.*, 1999 ; Gutierrez et *al.*, 2008).



Malgré l'existence de mécanismes de régulation communs à différentes espèces, la conservation des réponses moléculaires à la déshydratation entre expérimentations, reste faible. Et ce en raison des variations dans : la dynamique de stress, le stade de développement et les tissus analysés (Fleury et *al.*, 2010).

Au cours d'un stress hydrique, diverses observations mettent en évidence une forte régulation des PIPs aussi bien au niveau transcriptionnel que post transcriptionnel (Zhang et *al.*, 2007). L'induction des gènes AQP en réponse à des changements environnementaux peut se produire en l'espace de quelques heures (Galmes et *al.*, 2007). Diverses études d'expression des gènes aquaporines, ont révélées des profils d'expression variables, leur expression peut ainsi augmenter, diminuer ou demeurer invariable en condition de stress hydrique (Alexandersson et *al.*, 2005).

Chez *Arabidopsis thaliana*, des analyses d'expression de 13 PIPs (après application de différents stress abiotiques), indiquent que chaque gène est exprimé de manière prédominante dans un organe donné (feuilles, racines). Ces derniers peuvent être régulés positivement ou négativement en fonction du type de stress (sécheresse, froid, salinité... etc) (Jang et *al.*, 2004).

Diverses études d'expression rapportent également une corrélation positive entre l'accumulation des transcrits DHNs et la tolérance à divers stress de déshydratation (Allagulova et *al.*, 2003 ; Brini et *al.*, 2007 ; Melloul et *al.*, 2014). En effet, la majorité des gènes DHNs sont positivement régulés en réponse à divers stress abiotiques ainsi qu'à l'application de l'ABA, chez *Arabidopsis thaliana* un total de six gènes sur dix l'est (Close., 1997 ; Idilko., 2013).

La réponse transcriptomique initiale est composée d'un ensemble fondamental de gènes répondant à des stress multiples. Cette réponse devient de plus en plus stress spécifique avec le temps (Bhargava et Swant., 2013). Une spécificité qui peut être utilisée à bon escient à des fins d'amélioration.



## *Chapitre 2 | Matériel et méthodes*

### 1. Matériel végétal.

Le présent travail a porté sur sept génotypes de blé dur (*Triticum durum Desf*) d'origine locale et introduite, gracieusement fournis par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de Constantine (station El khroub). Les variétés locales se caractérisent par une meilleure adaptation et une faible productivité, tandis que celles introduites sont plus productives mais moins tolérantes aux aléas du climat (Bousbaa., 2013). Les génotypes utilisés sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Tableau.2.).

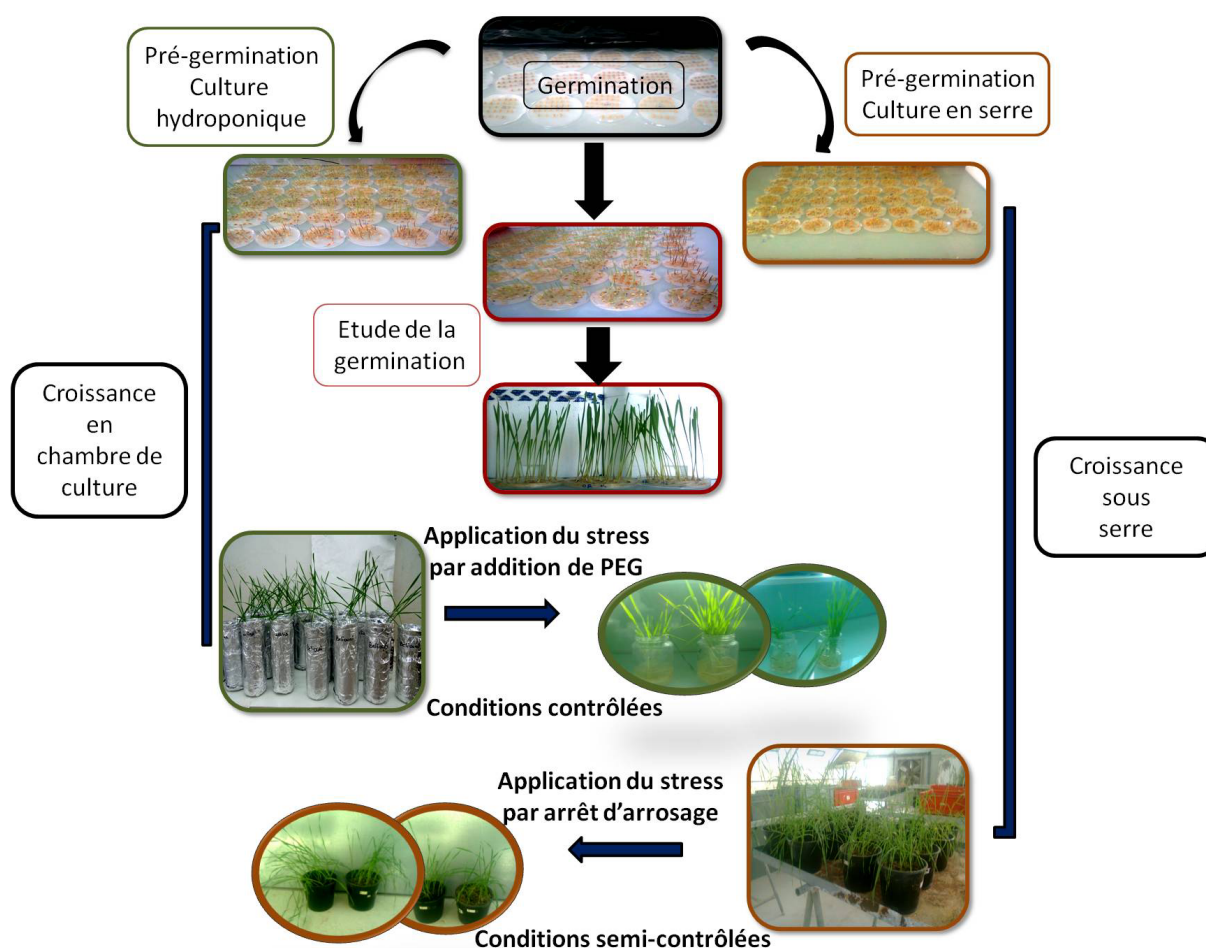
**Tableau.2.** : Liste des génotypes étudiés et leurs origines.

Génotypes	Code utilisé dans cette thèse	Origines	Essais
Djenah khetaifa	DK	Algérie (ITGC).	01, 02 et 03
Bidi 17	B17	Algérie.	01, 02 et 03
Guem Goum Rkham	GGR	Algérie (CIMMYTA).	01, 02 et 03
Oued Zenati	OZ	Algérie.	01, 02 et 03
Beliouni	B	Algérie (ICARDA).	01, 02 et 03
Bousselem	Bou	Algérie.	01, 02 et 03
Waha	W	Algérie (sélectionné à partir des F CIMMT).	01, 02 et 03

Essai 01 : germination, essai 02 : culture hydroponique, essai 03 : essai sous serre.

### 2. Conduite et organisation des essais

Deux expérimentations ont été menées : la première en chambre de culture, comportant deux essais, une étude de la germination ainsi qu'une étude de l'effet du stress hydrique osmotique en culture hydroponique (Figure.6.). Le déficit hydrique a été induit par différents traitements de polyéthylène glycol (PEG-6000). Tandis que pour la seconde expérimentation se déroulant sous serre en conditions semi-contrôlées, le déficit hydrique fut induit par arrêt d'arrosage (Figure.6.). Les essais ont été réalisés au niveau du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV), équipe de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), Chaabet El Rasses, Université des Frères Mentouri, Constantine. Ainsi qu'au niveau du Laboratoire de Protection et d'Amélioration des Plantes (LPAP), du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie.



**Figure.6.** Schématisation de la démarche expérimentale illustrant l'organisation de l'ensemble des essais réalisés.

### 3. Effet du déficit hydrique osmotique induit par le polyéthylène glycol PEG-6000

#### 3.1. Cultures et traitements

##### 3.1.1 .Le polyéthylène glycol PEG- 6000

Le PEG est un polymère de grand poids moléculaire, non ionique, hydrosoluble et non pénétrant pour les cellules (Chefdor., 2006). Il est fréquemment utilisé dans des approches expérimentales pour la sélection de cultivars tolérants au stress hydrique (Erdei et *al.*, 2002 ; Kocheva et *al.*, 2003 ; Jajarmi., 2009 ; Hamayun et *al.*, 2010 ; Balock et *al.*, 2012). Il induit un déficit hydrique, en agissant comme un agent osmotique abaissant le potentiel de l'eau d'une manière relativement contrôlée, appropriée aux protocoles expérimentaux et semblable à un séchage du sol (Heyser et Nabors., 1981 ; Oukarroum., 2007). Il réduit la disponibilité

en eau sans causer de dommage physique aux plantes. En effet, étant de haut poids moléculaire, il ne pénètre pas les plantes et constitue un osmoticum idéalement utilisable en milieux hydroponiques. La pression osmotique générée est fonction de la concentration et du poids moléculaire du PEG utilisé. Se présentant sous forme d'une large gamme de poids moléculaires allant de 300 à 20.000, ceux dont le poids moléculaire est de 6000 voire 8000 sont préférablement et plus fréquemment utilisés. Le PEG (PEG 6000) utilisé ne nécessite pas de purification avant utilisation, sa masse molaire est suffisamment élevée pour limiter l'absorption racinaire, tout en préservant la fluidité de la solution nutritive.

### 3.1.2. Germination

Le stress hydrique a été induit par des traitements de polyéthylène glycol, PEG-6000. La conception expérimentale était hiérarchique et complètement randomisée avec trois répétitions. Les graines ont été traitées avec de l'hypochlorite de sodium à 5% pendant 10 minutes, puis rincées abondamment avec de l'eau distillée. Les graines sont ensuite imbibées dans de l'eau distillée pendant 24h, puis pré-germé 48h à température ambiante. A ce stade l'expérimentation est scindée en deux parties.

Le premier lot de graines est mis à germer sur du papier filtre dans des boîtes de Pétri, à raison de 25 graines par boîte et par traitement de PEG, en chambre de culture à  $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  et avec une humidité relative  $70 \pm 5\%$ . Une gamme de trois potentiels osmotiques de 0MPa,

- 0,6MPa et -1,2MPa a été produite. Cinq ml de chaque solution a été ajoutée à chaque boîte de Pétri, chaque 48h. Dans le cas du contrôle ce fut de l'eau distillée (0MPa). Pour chaque traitement, les variables suivantes ont été considérées :

- Le taux de germination : Il est exprimé en pourcentage et représente le rapport entre le nombre de graines ayant germées et le nombre total de graines incubées (ISTA., 2003).

$$G\% = \frac{NGG}{NTG} \times 100.$$

G%: taux de germination, NGG : nombre de graines germées, NTG : nombre total de graines incubées.

- La longueur foliaire et racinaire.

- Le rapport longueur racinaire sur la longueur foliaire (LR/LF) (Kouakou et *al.*, 2008).

- Le nombre de racines émises (NBR).

Pour le second lot de graines, après gonflement et émergence des premières racines, ces dernières sont transférées dans des contenants en plastique, adaptés à la culture hydroponique. Après 21 jours de culture, la solution nutritive des deux lots de stressés est enrichie avec du PEG-6000, comme décrit ci-après.

### 3.1.3. Culture hydroponique et induction de la contrainte hydrique

Le mode de culture en hydroponie a été choisi car il permet : un meilleur contrôle et une meilleure homogénéisation de l'apport minéral (croissance rapide et contrôlée). L'obtention de racines saines, exemptes de toute perturbation pouvant interférer avec la réponse propre des plantes à la sécheresse (Dubos., 2001). Mais aussi, un meilleur contrôle du potentiel osmotique, en particulier suite à l'addition du PEG-6000 (Yang et *al.*, 2010). Ce polymère choisi pour l'induction du stress hydrique, ajouté à grande concentration, empêche la solidification des milieux nutritifs gélifiés. Il est plus facilement incorporé aux solutions nutritives liquides. Les contenants utilisés pour la culture hydroponique ont été opacifiés à l'aide d'un papier aluminium opaque. La composition de base de la solution nutritive est celle de la solution de *Broughton et Dillworth* apportant : sels minéraux et nutriments essentiels au bon développement des plantes. Cette dernière fut rajustée fréquemment selon la nécessité. Elle a également été renouvelée entièrement une fois par semaine, afin d'éviter un éventuel appauvrissement en éléments minéraux, des variations de PH et le développement de pathogènes.

La croissance des plantes s'est faite en chambre de culture avec une température de  $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , une humidité relative de  $70 \pm 5\%$  et une photopériode de 16h de lumière par 8h d'obscurité. La culture fut poursuivie pendant trois semaines. Le stress a été induit en remplaçant la solution nutritive initiale par une solution nutritive enrichie en PEG- 6000. Deux niveaux de stress ont été appliqués : un stress modéré de 10% de PEG (- 0,6 MPa) et un stress sévère de 20% de PEG (- 1,2 MPa). Le lot des témoins a été maintenu en culture en présence de solution nutritive. La mesure des différents paramètres a été effectuée après 3 et 5 jours de traitement.

### 3.2. Mesure de la température foliaire

La température d'une surface végétale est la résultante de son bilan énergétique. En effet, une fois absorbée sous forme de rayonnement, l'énergie peut être principalement dissipée de deux manières : par évapotranspiration et par échange de chaleur avec l'air environnant. En

l'absence de déficit hydrique, une ouverture stomatique maximale entraîne une dissipation de l'énergie par transpiration (Kotchi., 2004). De ce fait, l'élévation de la température du couvert est limitée. En situation de déficit hydrique afin de réduire ses pertes en eau, la plante ferme ses stomates (Silva et *al.*, 2007). Cette fermeture entraîne des modifications à différents niveaux d'organisation. Entre autre, elle va emprisonner l'énergie solaire absorbée qui sera dissipée sous forme d'un flux de chaleur, entraînant l'augmentation de la température foliaire. Cette augmentation permet par détection thermique, d'avoir accès au statut hydrique de la plante. La mesure de la température foliaire a été faite à l'aide d'un thermomètre infrarouge portatif (Figure.7.). Le thermomètre est maintenu de manière à pouvoir détecter la température de la feuille uniquement, en évitant de sonder la température d'autres surfaces. Les mesures sont effectuées sur la feuille non détachée de la plante et données en degré Celsius (°C).



**Figure.7.** Thermomètre infrarouge portatif model (IL, USA).

### 3.3. Taux de chlorophylle total (SPAD index)

L'estimation du contenu en chlorophylle est importante, car elle est directement liée aux capacités photosynthétiques de la plante. La teneur en chlorophylle est déterminée à l'aide d'un chlorophylle mètre portatif SPAD 502 de type Minolta (Nouri., 2002) (Figure.8.). Les mesures rapides, faites à l'aide de cet appareil ont l'avantage de ne pas être destructives. Il s'agit d'un radiomètre manuel qui mesure l'absorbance optique à deux longueurs d'ondes différentes. Une mesure dans le rouge, afin de déterminer la teneur foliaire en chlorophylle, et une mesure dans l'infrarouge qui donne des indicateurs, sur la structure de la feuille (absorptivité et épaisseur des tissus foliaires) (Bagard., 2008). Pour se faire, l'appareil mesure la transmittance de la feuille dans le rouge R (650nm) et le proche de l'infrarouge PIR (940nm), il calcule ensuite le ratio des transmittances qu'il donne sous forme d'un index en

unité SPAD, correspondant à la teneur foliaire en pigments chlorophylliens (Temagault., 2009). Les lectures sont faites sur une surface foliaire de l'ordre de (2mmx3mm). L'appareil doit être calibré (N=0), trois lectures sont effectuées au niveau de la même feuille (sommet, milieu, et base). La moyenne des trois valeurs s'affiche sur l'écran et c'est elle qui sera prise en considération. Nous avons donc effectué une mesure par plante.



**Figure.8.** Chlorophylle mètre Minolta SPAD 502 (*Spectrum technology Inc, IL, USA*).

### 3.4 .Mesure de la matière sèche

Au terme du stress imposé, le poids sec des parties aériennes et racinaires a été déterminé. Ces dernières, ont été lavées puis séchées à 80°C dans une étuve. La masse de matière sèche (MS) a été déterminée après 48h.

### 3.5 .Détermination du statut hydrique (TRE)

L'importance de l'eau au niveau des plantes est largement reconnue, étant nécessaire au maintien d'une turgescence propice à leur croissance ainsi qu'à leur survie. La teneur en eau (ou turgescence foliaire) est représentative de la capacité de la plante à conserver un niveau d'eau foliaire à même à lui assurer une continuité de son activité métabolique (Charfia., 2010). Elle constitue l'un des critères d'évaluation de la tolérance à la sécheresse proposés par Clark et Mac-Gaig., (1982).

La teneur relative en eau a été mesurée selon la méthode décrite par Barrs., (1968). Les feuilles ont été pesées immédiatement une fois coupées, il s'agit du poids frais (PF). Elles ont ensuite été réhydratées pendant 24h à l'obscurité dans un endroit frais (à 4°C), puis pesées à

nouveau, il s'agit du poids de la pleine turgescence (PPT). Le poids sec quant à lui, a été obtenu après passage des feuilles à l'étuve à 80°C, pendant 48h.

La teneur relative en eau a été calculée selon la formule de Clark et Mac-Caig., (1982) :

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

TRE= teneur relative en eau, PF= poids frais, PS= poids sec, PPT= poids de pleine turgescence.

### 3.6. Dosage des sucres solubles

Cette mesure est appliquée sur la matière fraîche des feuilles des différents lots étudiés. Les sucres solubles (totaux : saccharose, glucose, fructose, leurs dérivés méthyles et les polysaccharides) ont été dosés par la méthode au phénol de Dubois et *al.*, (1956).

Le glucose est extrait par de l'éthanol à température ambiante. 3ml d'éthanol à 80% ont été ajouté à 100mg de matière fraîche puis laissé à température ambiante et à l'obscurité pendant 48h. Au moment du dosage, une fois tout l'alcool évaporé par étuvage à 80°C, 20ml d'eau distillée ont été ajoutés. Ce qui constitue la solution à analyser. Les sucres ont ensuite été colorés par ajout de phénol et d'acide sulfurique concentré. On a ainsi obtenu, une solution jaune orange à la surface, après avoir ajouté à 2ml de la solution à analyser : 1ml de phénol à 5% (après agitation) et 5ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 96% (d= 1.86). Un passage au vortex permet d'homogénéiser la solution. Les tubes ont été maintenus 10 à 20 minutes dans un bain marie à 30°C. L'absorbance fut lue à une longueur d'onde de 485nm, les concentrations ont été déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage tracée au préalable dans les mêmes conditions à partir du glucose anhydre (Figure.9.).



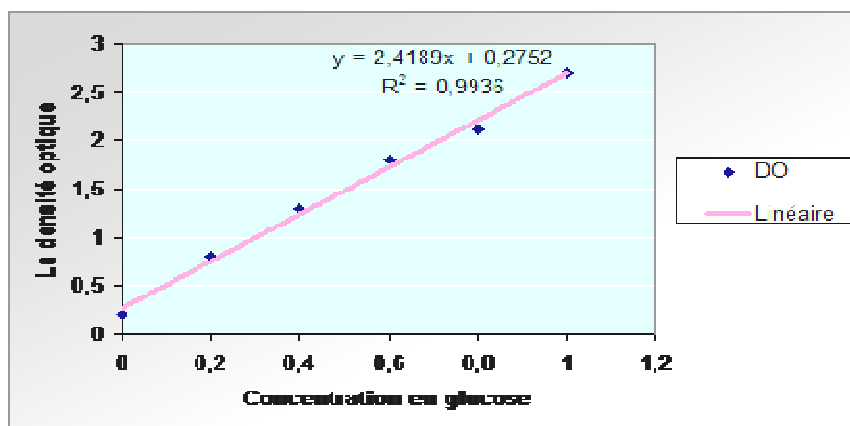


Figure.9. Courbe d'étalonnage des sucres solubles.

### 3.7. Traitement et analyse statistique

Dans le but de mieux décrire les différentes variables précédemment mentionnées, nous avons calculé la moyenne, ainsi que l'écart type qui mesure la dispersion des données autour de la moyenne. Ces deux paramètres ont été calculés à l'aide d'un logiciel d'analyse statistique Xlstat 2010.

Afin de tester les différences entre les traitements, les durées et les génotypes, une analyse de variance a été réalisée. La significativité statistique des différences observées entre les moyennes a été testées avec le test de Newman-Keuls au seuil de signification de 5% avec le logiciel Xlstat 2010. Une analyse de variance à trois facteurs (Génotype, Traitement, Durée) a également été réalisée à l'aide du programme Cropstat 2007 2.3.

### 3.8. Analyse des protéines thermostables

#### 3.8.1 .Extraction des protéines thermostables

L'extraction des protéines thermostables a été réalisée selon le protocole décrit par Brini et *al.* (2007). Le matériel végétal (100 mg), en l'occurrence les feuilles, a été broyé dans de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette dernière fut conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à extraction des protéines. Les protéines thermostables ont été extraites dans 1ml de tampon d'extraction [50mM Tris-HCl à pH 8, 10mM NaCl, 1% SDS, 5% mercaptoethanol] (Annexe). Le mélange fut vortexé pendant 30 sec pour homogénéiser le tous. Il a ensuite été placé dans un bain marie à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min, puis immédiatement plongé dans de la glace pendant 15 min. Après centrifugation à 10.000 rpm durant 15 min à  $4^{\circ}\text{C}$ , le surnageant a été récupéré et précipité avec du TCA (concentration finale 30%) pendant 30 min dans de la

glace. Après une 2<sup>ème</sup> centrifugation à 10.000 rpm pendant 15 min à 4°C, le culot a été lavé deux fois avec de l'acétone à 80% et repris dans du tampon de Laemmli concentré deux fois.

### 3.8.2. Séparation des protéines sur gel 1D SDS-PAGE

Il s'agit d'une électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide, faite en condition dénaturante. La SDS-PAGE s'appuie sur un système de tampon discontinu comportant du Sodium- Dodécyl- Sulfate (SDS). Elle a été réalisée selon la méthode de Laemmli., (1970) citée par De leonardis et *al.*, (2007). Le SDS étant un détergent anionique fort, il entraîne la réduction de la structure spatiale en se fixant sur les protéines et en les enveloppant de charges négatives. La migration se fait alors en fonction de la masse molaire (Dicko., 2006). Deux ions de mobilité électrophorétique différente forme un front de migration lorsque le voltage est appliqué. Comme le front de migration traverse le gel, l'effet de tamisage de la matrice de polyacrylamide entraîne la mobilité des protéines à des vitesses différentes. La capacité d'entassement est à l'origine du haut pouvoir de résolution de la SDS-PAGE.

La séparation des protéines est réalisée sur un gel discontinu de polyacrylamide composé d'un gel de concentration et d'un gel de séparation (Annexe). Le premier sert à stoker les impuretés à tasser et à concentrer les protéines avant leur passage dans le gel de séparation, tandis que ce dernier entraîne le fractionnement des protéines selon leur poids moléculaire.

-Le gel de séparation (runing gel) :

Ce gel possède les caractéristiques du maillage suivantes T= 12% et C=0,97%, ses dimensions sont de 7,3x 6cm. Il est constitué d'acrylamide, de N-N'- méthylen- Bis acrylamide (37/1), de tris HCL à pH=8,8, de SDS à 0,1% et d'eau distillée. La polymérisation est quand à elle, assurée par des précurseurs de polymérisation : l'ammonium Persulfate (APS) à 0,1% et le TEMED à 0,04% (Annexe), qui doivent être ajouté en dernier.

-Le gel de concentration (stacking gel) :

Les dimensions de ce gel sont de 7,3x 2cm. Il possède les caractéristiques suivantes T= 2,8% et C=1,4%. Il comporte les mêmes constituants que le gel de séparation, avec les mêmes concentrations sauf pour le Tris HCL qui à un pH de 6,8 au lieu de 8,8 (Annexe).

Le système d'électrophorèse est constitué de deux plaques : une plaque 'réservoir' portant la cuve d'électrophorèse et une plaque gel portant le gel d'acrylamide. Les deux plaques doivent préalablement être nettoyées ; le système de coulage est monté selon la notice du fournisseur

(Biorad). Les plaques sont assemblées en plaçant un *spacer* de chaque côté et fixé à l'aide de pince. Le tampon d'électrophorèse contient de la glycine 1,29M, du Tris 0,25M et du SDS à 1% (Annexe).

### 3.8.3 .Conditions de migration et révélation

La migration a été conduite à ampérage constant (80 mA) jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. Les gels sont colorés au bleu de coomassie : dans un mélange de 45 % de méthanol, 10 % d'acide acétique et 0.25 % de bleu de coomassie. La coloration fut faite à température ambiante sous agitation constante. Les gels ont ensuite été décolorés dans un mélange de 30 % de méthanol et de 10 % d'acide acétique (solution de décoloration). L'un des puits de chaque gel est consacré au marqueur de poids moléculaire *Kit LMW (Low Molecular Weight) Ge Healthcare UK* (Tableau.3.).

**Tableau.3.** Poids moléculaire des protéines de références du Kit LMW (*Low Molecular Weight*).

Protéine	Poids moléculaire (KDa)
Phosphorylase b	97
Albumine sérique bovine	66
Ovalbumine	45
Carbonique anhydrase	30
Inhibiteur de la trypsine	20.1
$\alpha$ -lactalbumine	14.4

### 3.8.4. Traitement des données

Les photos des gels obtenues, ont été analysées à l'aide du logiciel *Photocapt 8*. Il calcule le poids moléculaire de chaque bande détectée, en effectuant une comparaison entre son rapport frontal et celui des différentes bandes du marqueur de poids moléculaire (dont les tailles sont connues).

## 4 .Effet du déficit hydrique induit par un arrêt de l'arrosage

### 4.1. Conditions de culture

Les graines ont été traitées avec de l'hypochlorite de sodium à 5% pendant 10min, ensuite elles ont été rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée. Puis elles ont été mises à germer sur papier absorbant et placées dans des contenants en plastique à l'obscurité. Au bout de 48h, les graines germées sont transplantées dans des pots en plastique, contenant un mélange de terre et de sable dans les proportions (2:1 v/v), à raison de 5 plantes par pot et de trois répétitions. La culture est conduite sous conditions semi-contrôlées : photopériode de 16h/J ; température 25-30°C, humidité relative de l'air 45-60%. La croissance des plantes s'effectue sous un éclairage naturel. Le dispositif expérimental est un 'split-plot', en bloc randomisé avec deux traitements hydriques (bien irrigué et stressé). L'irrigation des plantes est effectuée régulièrement à la capacité au champ jusqu'au stade d'application du stress.

### **4.2. Application des niveaux de stress**

Les pots placés sous serre sont irrigués régulièrement, tous les deux jours jusqu'à l'obtention de la troisième feuille, à ce stade le stress hydrique est imposé, en retenant l'alimentation en eau et ce pendant deux semaines pour l'application d'un stress sévère. Les plantes contrôles quant à elles, ont été arrosées de manière régulière à saturation, tous au long de l'expérimentation.

### **4.3. Mesure de la température foliaire**

La température foliaire a été mesurée à l'aide d'un thermomètre infrarouge, de manière non destructive sur les feuilles des différentes plantes, à raison de trois répétitions par génotype et par traitement.

### **4.4. Teneur en chlorophylle totale**

Le contenu en chlorophylle a été déterminé à l'aide d'un chlorophylle mètre de type SPAD. Les lectures ont été faites, sur les feuilles complètement attachées aux plantes, bien irriguées et stressées à raison de trois répétitions par génotype et par traitement.

### **4.5. Conductance stomatique**

Deux des plus importants processus végétaux, la photosynthèse et la transpiration sont contrôlés par les stomates. Ainsi, plus de 95% du dioxyde de carbone (entrant pour la photosynthèse) et la vapeur d'eau (sortante par transpiration) échangés entre la feuille et l'atmosphère, passent par les stomates (Dumont., 2013). De part son importance capitale, la

régulation de la conductance stomatique est déterminante pour l'adaptation des plantes, à un environnement en continuel changement et notamment en situation stressante.

La résistance stomatique des feuilles a été mesurée à l'aide d'un Poromètre à diffusion de vapeur d'eau, type *Delta Devices MK3<sup>R</sup>*, sur la partie médiane de la feuille (Ykhlef., 2001) (Figure.10.). L'utilisation de ce système portatif muni d'une pince à coupelle dotée d'un détecteur de vapeur, consiste à insérer la partie médiane de la feuille, non détachée de la plante dans la pince (la face supérieure doit être en regard du détecteur de vapeur) (Herbinger et *al.*, 2002). L'évaluation de la concentration en vapeur d'eau permet de calculer la résistance totale de la feuille, à la diffusion de la vapeur d'eau, laquelle permet de déterminer par la suite, la conductance stomatique. Le temps nécessaire et la vitesse d'humidification de la coupelle sous l'effet de la transpiration foliaire dépendent essentiellement, du degré d'ouverture des stomates. Les valeurs données par le poromètre correspondent à la résistance stomatique ( $r_s$ ) dont sera déduite la conductance stomatique ( $g_s$ ) de part la formule suivante :

$$g_s = 1/r_s.$$

$g_s$  : conductance stomatique,  $r_s$  : résistance stomatique.



**Figure.10.** Poromètre à diffusion de vapeur type *Delta Devices MK3<sup>R</sup>*.

#### 4.6. Conductivité électrolytique

Le degré de dommage membranaire causé par l'application du stress hydrique, a été indirectement évalué en mesurant la conductivité électrolytique, celle-ci est inversement proportionnelle à la stabilité membranaire cellulaire (Farooq et Azami., 2001).

$$CMS= I-EL$$

CMS= (Cell Membrane Stability) stabilité membranaire des cellules, EL= (Electrolyte leakage) conductivité électrolytique.

La conductivité électrolytique a été déterminée selon la méthode décrite par Dkhil et Denden., (2012). Les feuilles ont d'abord été lavées avec de l'eau distillée afin d'enlever tout résidu ou électrolyte pouvant adhérer à la surface, puis coupées en petits disques de taille uniforme. Les échantillons ont ensuite été immergés dans 10mL d'eau distillée et incubés à température ambiante. Après 24h, la première conductivité ( $C_1$ ) a été lue à l'aide d'un conductimètre (Figure.11.). Par la suite, les échantillons ont été autoclavés à 120°C pendant 20min. La deuxième lecture ( $C_2$ ) fut effectuée, après avoir laissé la solution refroidir à température ambiante. La conductivité électrolytique a été estimée d'après le ratio  $C_1/C_2$ .



**Figure.11.** Conductivimètre de type LF 92 (WTW GmbH, Germany).

#### 4.7. Détermination de la Teneur Relative en Eau

Le contenu relatif en eau a également été déterminé à partir des feuilles des plantes témoins et des plantes stressées par arrêt d'irrigation. La méthode est décrite dans la section 3.5.

#### 4.8. Traitement et analyse statistique

Dans le but de mieux décrire les différentes variables précédemment mentionnées, nous avons calculé la moyenne ainsi que l'écart type qui mesure la dispersion des données autour de la moyenne. Ces deux paramètres ont été calculés à l'aide d'un logiciel d'analyse statistique Xlstat 2010.

Afin de tester les différences entre les traitements et les génotypes, une analyse de variance à deux facteurs a été réalisée. Les différences significatives des moyennes ont été testées avec le test de Newman-Keuls au seuil de signification de 5%.

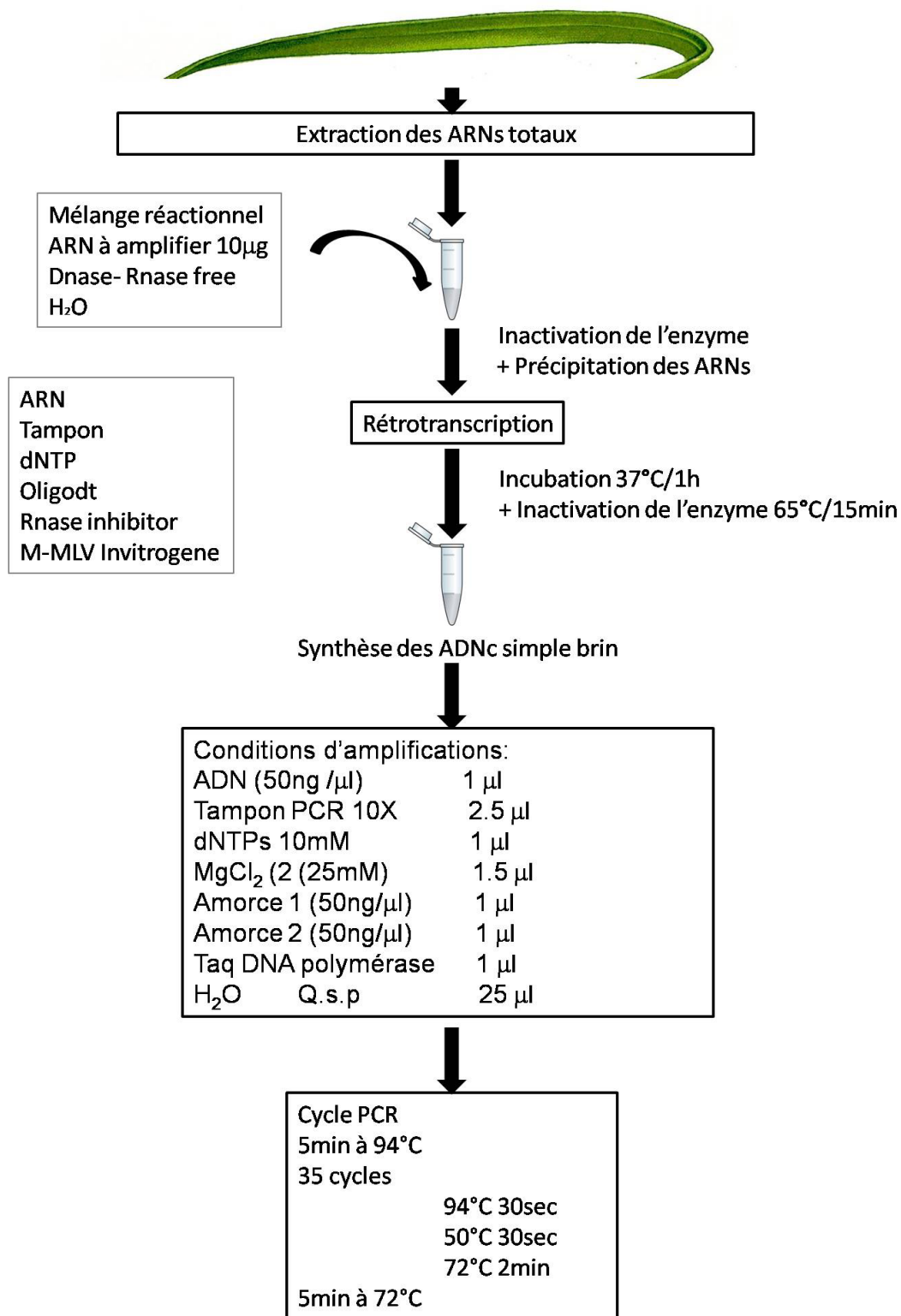
### **5. Analyse d'expression des gènes candidats : l'aquaporine TdPIP2,1 et la déhydrine DHN-5**

La rétrotranscription suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne, est une technique de choix pour analyser l'expression des mRNA dérivant de diverses sources (Pfaffi., 2001). Partant d'une faible quantité de matériel de départ (généralement de l'ARN total), l'investigateur est en mesure de produire par transcription inverse, un ADN complémentaire simple brin. Le cDNA étant beaucoup moins enclin à la dégradation que l'ARN, il peut donc être amplifié par PCR et quantifié, afin de déterminer l'abondance relative des gènes exprimés dans une condition donnée (Walker et *al.*, 2003).

Cette technique a été utilisée pour étudier l'expression du gène DHN-5 et du gène TdPIP2,1 au niveau : des feuilles, des racines et des gaines, au cours de la contrainte hydrique imposée par arrêt d'arrosage ainsi que suite à l'application d'un traitement au PEG-6000 à 10% et 20%.

#### **5.1. Extraction des ARN totaux par la méthode du Trizol**

Le matériel végétal a été broyé dans de l'azote liquide et réduit en une poudre fine. Le broyat (100mg) a été repris dans 1mL de tampon d'extraction Trizol. Après homogénéisation vigoureuse, le mélange a été incubé à température ambiante pendant 5min et ce, afin de dissocier les complexes nucléoprotéiques. L'extraction des acides nucléiques a été renouvelée avec 200ml de chloroforme-alcool-isoamélique (24:1), après agitation, le mélange a été incubé 2min à température ambiante, puis centrifugé à 12000 rpm pendant 15min à 4°C. Une fois récupéré, à la phase aqueuse ont été ajouté 0,5mL d'isopropanol froid et incubé 10min à température ambiante. Après une centrifugation de 10min à 12000rpm et à 4°C, le précipité a été lavé avec de l'éthanol froid à 70%, centrifugé à 7500rpm durant 10min à 4°C. Finalement le culot fut tout d'abord séché, puis repris dans de l'eau traitée au DEPC (Figure.12.). La qualité des ARNt a été contrôlée sur un gel d'agarose de 1,5% et visualisée sous UV.



**Figure.12.** Schématisation des étapes successives de la quantification des transcrits par RT-PCR semi-quantitative.



### 5.2. Synthèse des ADNc par transcriptase reverse

Après vérification de la qualité des ARNs extraits, une transcription inverse a été réalisée sur 10µg d'ARN totaux pour chaque traitement imposé. En premier lieu les ARNs ont été traités par de la DNase pendant 1h30 à 37°C, le mélange réactionnel comporte les proportions suivantes : 10µg d'ARN, 1µl de DNase-RNase free (10 unité/ µl), le volume fut alors complété à 20 µl par de H<sub>2</sub>O. Suite à l'inactivation de l'enzyme à 65°C, les ARN précipités ont été repris dans 10 µl d'eau DEPC (H<sub>2</sub>O DEPC). Après une dénaturation de l'ARN à 80°C pendant 5min et une incubation dans la glace, l'ADNc fut synthétisée dans un mélange réactionnel contenant (en plus de 9 µl d'ARN dénaturé) : 4 µl de tampon 5X, 2 µl de dNTPs (10mM), 2 µl d'OligodT, 1 µl de RNase inhibiteur et 2 µl d'enzyme M-MLV (5U/ µl) (Invitrogen). L'ensemble a été incubé à 37°C pendant une heure. La réaction fut arrêtée par l'inactivation de l'enzyme à 65°C (15min). Le produit de la réaction de rétrotranscription a été dilué, puis utilisé comme matrice, pour l'amplification PCR des deux gènes candidats (Figure.12.).

### 5.3. Amplification PCR des ADNc

Nous avons utilisé des amorces spécifiques de l'ADNc DHN-5 (Brini *et al.*, 2007) et ainsi que celui de l'ADNc TdPIP2,1 (Ayadi *et al.*, 2011) afin d'étudier leur expression, mais aussi des amorces spécifiques de la région d'ADNc codant pour l'actine (Tableau.4.). L'amplification de ce dernier nous permet de disposer d'un témoin interne du fait de l'expression constitutive et invariante du gène codant pour cette protéine. Les amorces ont été fournies par Dr. Faïçal Brini, Pr. Khaled Masmoudi et Malika Ayadi (Centre de Biotechnologie de Sfax).

L'étape de l'amplification est réalisée dans un mélange réactionnel de 25 µl contenant :

- 1 µl d'ADN (50ng / µl)
- 2,5 µl de tampon PCR 10X
- 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 1 µl de dNTPs (10mM)
- 1 µl de l'amorce 1 (50ng/ µl)
- 1 µl de l'amorce 2 (50ng/ µl)

-1 µl de Taq DNA polymérase

-Q.s.p 25 µl de H<sub>2</sub>O.

Une PCR de 35 cycles a été réalisée dans les conditions générales suivantes :

-Une étape de dénaturation initiale de 3min à 94°C

-35 cycles comprenant :

-Une étape de dénaturation à 94°C (30sec)

-Une étape d'hybridation des amorces à une température spécifique de ces dernières (30sec)

-Une étape d'élongation à 72°C de 2min

-Une étape d'élongation finale de 5min (Figure.12.).

**Table.4.** Amorces utilisées pour l'analyse d'expression.

Séquence de l'amorce (5' to 3')	Gene candidat	Numéro d'accession Gene bank	Taille de l'amplicon (bp)
TCCATCCAACACCAACACTAATAAC GGCGTACCACCAGTACATCC	TdPIP2,1	EU182655.1	400
GCGAATTTCGAGGACGACGGCATGGGC GAATTCTCAGTGCTGGCCTGGG	DHN5	AY619566.1	344
GTGCCCATTTACGAAGGATA GAAGACTCCATGCCGATCAT	Actine	AB181991	380

#### 5.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

La qualité des ARNs ainsi que l'analyse des produits de l'amplification de PCR ont été déterminées par électrophorèse en gel d'agarose en présence de BET (bromure d'ethidium 1mg/1ml). La migration électrophorétique a été effectuée dans du tampon TAE 1X (0,04 M Tris-acétate, 0,001 M EDTA) et le tampon de dépôt utilisé est 6 fois concentré (0,25% bleu de bromophénol, 40% de saccharose). Ils ont ensuite été visualisés sous un éclairage ultraviolet (UV). Cette étape est particulièrement importante pour vérifier l'intégrité des ARNs. Pour les produits d'amplification de PCR, le pourcentage d'agarose a été adapté afin d'effectuer une meilleure séparation, des gels à 1,5% d'agarose ont été réalisés.

## *Chapitre 3 |*

*Caractérisation de la réponse au stress hydrique de quelques variétés de blé dur (*Triticum durum*, Desf.)*

### Introduction

L'analyse de la réponse des plantes aux fluctuations de leur environnement permet de produire une sorte de photographie instantanée des modifications physiologiques mises en place et d'établir un système bien caractérisé pour l'analyse des événements au niveau moléculaire.

Le stress hydrique affecte plusieurs variables de fonctionnement de la plante telles que la température foliaire, la conductance stomatique, la surface foliaire, la transpiration ou encore la photosynthèse. L'incidence du stress sur certaines de ces variables possède une répercussion sur d'autres variables. Lors d'un déficit hydrique les stomates se ferment afin de réduire les pertes en eau (Tardieu et Dreyer., 1997). Une fermeture ayant pour conséquence l'augmentation de la température foliaire, une réduction de l'assimilation du  $\text{CO}_2$  et peut conduire à une réduction de l'activité photosynthétique. Une diminution de la teneur relative en eau de la plante se traduit immédiatement par une réduction de la croissance en dimension avant même que la photosynthèse ne soit affectée.

L'efficacité des réponses physiologiques et biochimiques à l'égard de la contrainte hydrique, peut changer considérablement parmi les espèces. En règle générale, les stratégies de tolérance impliquent des mécanismes divers permettant aux plantes de survivre au manque d'eau (Levitt., 1980). Les mécanismes de tolérance sont très complexes et reflètent l'intégration de variétés de réponses à différents niveaux d'organisation. Deux types de mécanismes d'adaptation sont principalement considérés, le mécanisme d'évitement et le mécanisme de tolérance. Toutefois, aucune de ces stratégies ne peut être considérée à elle seule en tant que base pour les programmes de sélection, dans la mesure où c'est la combinaison de ces deux mécanismes qui confère à la plante son aptitude à la tolérance.

Etudier l'interface reliant l'aspect moléculaire touchant l'expression des gènes réagissant au stress et l'aspect physiologique et biochimique de la réponse des plantes est crucial. Cela permettra de transformer les données recueillies en application pratique, afin d'améliorer la production céréalière malgré les conditions limitantes (Bruce et *al.*, 2002 ; Suprunova et *al.*, 2004).

Pour mettre en évidence les réponses des différentes variétés de blé dur (locales et introduites) testées, un stress hydrique a été induit par :

- Application de différentes concentrations de polyéthylène glycol PEG-6000, polymère de haut poids moléculaire, utilisé pour simuler l'effet d'un stress hydrique sur les plantes (Erdei et *al.*, 2002 ; Kocheva et *al.*, 2003; Balock et *al.*, 2012).
- Application d'une période de stress hydrique induite par l'arrêt d'arrosage des plantes pendant deux semaines.
- Plusieurs paramètres biophysiques, physiologiques et biochimiques (Température foliaire, conductance stomatique, Taux de chlorophylle, teneur relative en eau etc) ont été utilisés comme des indicateurs afin d'élucider l'effet du stress hydrique et l'état physiologique des plantes.

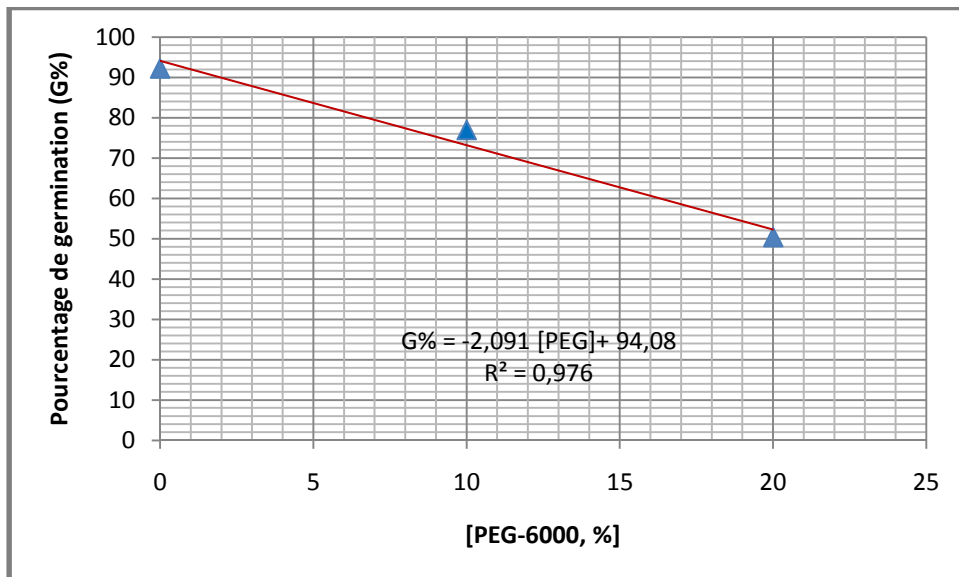
## Résultats

### 1. Effet du déficit hydrique osmotique induit par le polyéthylène glycol-6000 sur le processus de germination

#### 1.1. Capacité de germination des graines

Le présent essai a pour but, d'étudier les effets de la quantité d'eau disponible, pendant la phase germinative des graines des différentes variétés de blé dur testées. Les pourcentages finaux de la germination, comparativement au contrôle, diminuent au fur et à mesure que le potentiel osmotique augmente. L'ampleur de cette diminution varie selon les variétés (Figure.14.). L'émergence de l'axe de la tige n'a pas été observée chez toutes les graines ayant germées.

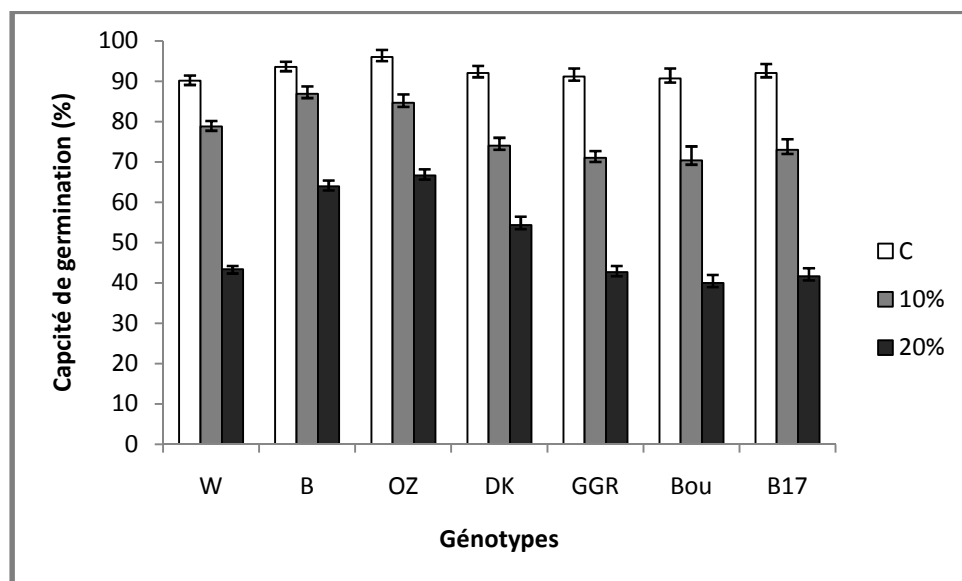
L'analyse des mesures effectuées montre un effet dépressif du stress hydrique osmotique, induit par le PEG-6000 sur le taux de germination des graines. En moyenne des sept variétés étudiées, le taux de germination est réduit de -2,091% pour toute augmentation de la concentration en PEG (Figure.13.). L'effet stress hydrique et l'effet variété sont significatifs, ainsi que l'effet interaction (Génotype x Traitement) (Tableau.5.).



**Figure.13.** Effet des différentes concentrations de PEG-6000 sur le pourcentage de germination des graines (moyenne des sept variétés de blé dur testées).

Ces résultats confirment l'effet du PEG-6000, sur le taux de germination des variétés de blé dur étudiées, mais aussi une différence de sensibilité entre génotypes vis-à-vis de cette contrainte. Certaines variétés se montrent plus sensibles à mesure que la concentration du

PEG-6000 augmente, alors que d'autres y réagissent relativement à moindre mesure. En effet les variétés OZ et B ont montré un plus haut potentiel de germination. Le pourcentage de germination chez OZ est de 96%, 85%, 66% respectivement à 0MPa, -0,6MPa et -1,2MPa. Chez la variété B, il était respectivement de 93,5% à 0MPa, de 86,83% à -0,6MPa et de 63,96% à -1,2MPa (Figure.14.). Globalement les taux de diminution enregistrés à -0,6MPa sont plus faibles que ceux enregistrés à -1,2MPa.



**Figure.14.** Evolution de la capacité de germination sous condition contrôle (C) et sous différentes conditions de stress hydrique (PEG-6000 à 10% et à 20%) chez les variétés de blé dur étudiées. Les valeurs constituent les moyennes $\pm$ SD (n=3).

**Tableau.5.** Carrés moyens de l'analyse de variance du pourcentage de germination, après 24h (G24), après 72h (G72) et le pourcentage de germination final (G%) des variétés de blé dur testées.

Facteurs	Paramètres		
	G24	G72	G
Génotypes (G)	28,319***	586,549***	360,962***
Traitement hydrique (T)	9918,893***	21030,505***	9407,606***
Interaction (G x T)	28,319***	120,081***	81,019***

ns : effet non significatif, \* : effet significatif  $p < 0,05$ , \*\* : effet hautement significatif  $p < 0,01$ , \*\*\* : effet très hautement significatif  $p < 0,001$ .

### 1.1.1. Taux de germination après 24h et après 72h

Le taux de germination estimé après 24h, est considéré comme étant plutôt élevé en condition contrôle (0MPa) avec une moyenne de 37%. Par opposition le taux de germination estimé à ce moment, en condition stressante et ce quelle que soit la concentration du PEG, est de 0%. Le taux de germination en condition contrôle se trouve être variable entre géotypes. Ainsi, la variété B17 a présenté le taux le plus élevé avec 45% et la variété Bou a présenté le taux le plus bas avec 30% (Tableau.6.).

**Tableau.6.** Taux de germination après 24h (%) sous condition contrôle (0MPa) et en présence de PEG-6000 (-0,6MPa et -1,2MPa).

Géotypes/Traitements	0MPa	-0,6MPa	-1,2MPa
W	31,66 <sup>d</sup> ±1,88	0	0
B	40,00 <sup>b</sup> ±0,00	0	0
OZ	40,66 <sup>b</sup> ±1,15	0	0
DK	35,66 <sup>c</sup> ±1,15	0	0
GGR	40,00 <sup>b</sup> ±0,00	0	0
Bou	30,33 <sup>d</sup> ±1,75	0	0
B17	45,16 <sup>a</sup> ±1,52	0	0
moy	31,66	0	0

Les valeurs constituent les moyennes±SD.

**Tableau.7.** Taux de germination après 72h (%) sous condition contrôle (0MPa) et en présence de PEG (-0,6MPa et -1,2MPa).

Géotypes/Traitements	0MPa	-0,6MPa	-1,2MPa
W	90,10 <sup>b</sup> ±1,35	45,00 <sup>e</sup> ±1,00	23,35 <sup>h</sup> ±0,84
B	93,50 <sup>ab</sup> ±1,32	60,00 <sup>c</sup> ±1,50	43,96 <sup>e</sup> ±1,45
OZ	96,00 <sup>a</sup> ±1,80	60,66 <sup>c</sup> ±0,57	46,66 <sup>e</sup> ±1,52
DK	92,00 <sup>b</sup> ±1,80	55,00 <sup>d</sup> ±0,86	34,33 <sup>f</sup> ±0,52
GGR	91,16 <sup>b</sup> ±2,02	30,66 <sup>fg</sup> ±1,05	22,66 <sup>h</sup> ±1,52
Bou	90,66 <sup>b</sup> ±2,51	30,33 <sup>g</sup> ±1,52	23,33 <sup>h</sup> ±1,15
B17	92,00 <sup>b</sup> ±2,29	45,00 <sup>e</sup> ±0,75	25,00 <sup>h</sup> ±1,02
moy	92,20	45,00	31,33

Les valeurs constituent les moyennes±SD.



Suite à l'écoulement de 72h, le taux de germination enregistré atteignant les 90% est détenu par le génotype OZ à une pression de 0MPa. Comparativement à une pression de -0,6MPa, le taux le plus élevé est de 60% chez B et OZ tandis que le taux le plus bas est de 30% chez GGR et Bou (Tableau.7.). Concernant le traitement à -1,2MPa l'intervalle des valeurs enregistrées se situe entre 40% et 21% (Tableau.7.). A ce niveau de stress, le taux est plus influencé par le potentiel osmotique. Les concentrations croissantes du PEG-6000 ont tendance à retarder le temps de germination.

L'analyse de variance confirme l'effet significatif du stress osmotique sur le taux de germination, aussi bien après 24h qu'après 72h d'exposition. Il en est de même pour l'effet génotype et l'effet interaction (Génotype x Traitement) (Tableau.5.). Ce qui suggère que la pression osmotique appliquée a un effet négatif, en réduisant les pourcentages de germination. Les différences observées entre variétés dépendent de l'intensité du stress, ceci en fait un paramètre sensible au déficit hydrique osmotique.

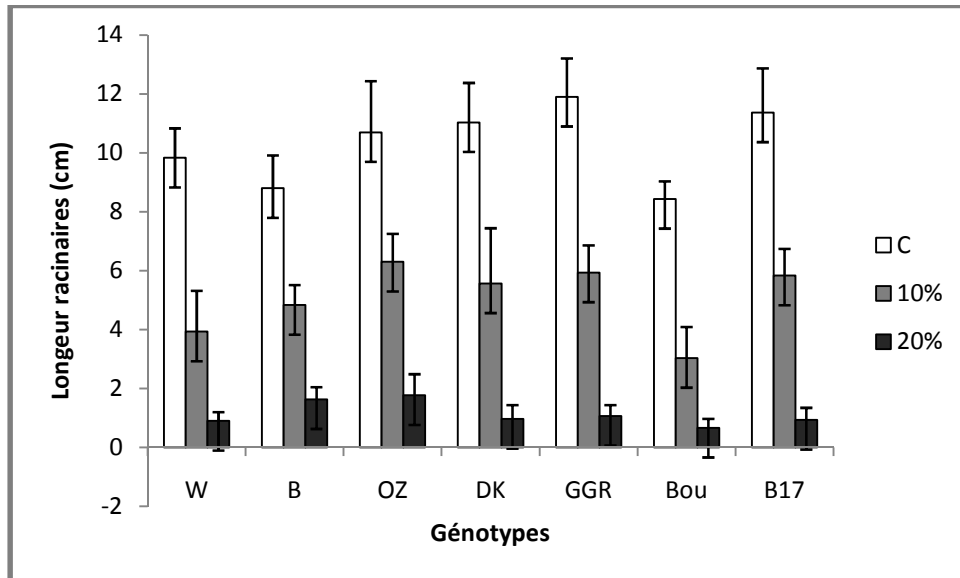
### **1.2. Evolution des longueurs racinaires (LR)**

La longueur des racines peut être considérée comme un important critère de tolérance à la sécheresse. Les variétés développant un système racinaire important possèdent une meilleure aptitude à pomper l'eau se trouvant en profondeur, ce qui leur permet de mieux tolérer certaines périodes sèches. Les longueurs racinaires relevées diffèrent entre les variétés testées.

En condition contrôle à 0MPa, les longueurs sont comprises entre 11,9cm, comme valeur maximale détenue par le génotype GGR et une valeur minimale de 8,43cm chez Bou. Suite à l'application d'une pression osmotique de -0,6MPa, les valeurs enregistrées alors varient entre 6,3cm et 3,03cm respectivement chez OZ et chez Bou. A -1,2MPa, les longueurs racinaires accusent une baisse plus importante avec une valeur moyenne de 1,13cm (Figure.15.).

Les résultats de l'analyse de variance montrent une différence significative pour l'effet stress, ainsi qu'un effet génotype significatif. Toutefois l'interaction (Génotype x Traitement) n'est pas significative. Ce qui implique que les différences variétales observées sont indépendantes de la concentration en PEG-6000 (Tableau.9.).

Les longueurs racinaires diminuent de  $-0,458\text{cm}$  pour toute augmentation de la concentration en PEG. Le modèle linéaire a la forme suivante :  $\text{LR} [\text{cm}] = -0,458\text{cm} [\text{PEG}] + 10,07$   $R^2 = 0,933$ .



**Figure.15.** Evolution de la longueur racinaire sous condition contrôle (C) et sous différentes conditions de stress hydrique (PEG-6000 à 10% et à 20%) chez les variétés de blé dur étudiées. Les valeurs constituent les moyennes  $\pm$ SD (n=3).

### 1.3. Evolution des longueurs foliaires (LF)

Les résultats de l'analyse de variance des longueurs foliaires indiquent un effet génotype et un effet stress hydrique osmotique significatif, alors que l'interaction ne l'est pas (Tableau.9.). Ceci suggère que les différences observées entre variétés sont indépendantes de l'intensité du stress. Les plus grandes valeurs sont observées au niveau du traitement à 0MPa tandis que les valeurs les plus basses (voir une inhibition totale) sont observées pour le traitement  $-1,2\text{MPa}$ .

L'émission des feuilles suite à la germination est cruciale pour le développement des jeunes plantules qui deviendront alors autotrophes. En condition standard à 0MPa, les longueurs observées à l'issue de l'expérimentation varient entre  $13,16\text{cm}$  pour B17 et  $10,8\text{cm}$  pour W. La longueur moyenne est de  $5,33\text{cm}$  à  $-0,6\text{MPa}$  et à  $-1,2\text{MPa}$  elle est de  $0,25\text{cm}$ , en notant que chez la majorité des génotypes elle est égale à  $0\text{cm}$  (Tableau.8.).

Les longueurs foliaires diminuent de  $-0,594\text{cm}$  pour toute augmentation de la concentration en PEG. Le modèle linéaire a la forme suivante :  $\text{LF} [\text{cm}] = -0,594\text{cm} [\text{PEG}] + 11,85$   $R^2 = 0,939$ .

**Tableau.8.** Evolutions des longueurs foliaires (cm) sous condition contrôle (0MPa) et en présence de PEG (-0,6MPa et -1,2MPa).

Génotypes/Traitements	0MPa	-0,6MPa	-1,2MPa
W	10,80 $\pm$ 1,31	3,00 $\pm$ 1,11	0
B	12,16 $\pm$ 1,51	6,50 $\pm$ 0,95	0,85 $\pm$ 0,22
OZ	12,73 $\pm$ 1,44	7,40 $\pm$ 1,01	0,92 $\pm$ 0,41
DK	12,03 $\pm$ 2,35	5,90 $\pm$ 1,11	0
GGR	13,00 $\pm$ 2,58	5,86 $\pm$ 0,92	0
Bou	11,10 $\pm$ 1,76	2,93 $\pm$ 1,00	0
B17	13,16 $\pm$ 0,96	5,76 $\pm$ 0,97	0
moy	12,14	5,33	0,25

Les valeurs constituent les moyennes $\pm$ SD.

**Tableau.9.** Carrés moyens de l'analyse de variance des longueurs foliaires (LF), des longueurs racinaires (LR) et du nombre de racines (NRB) des variétés de blé dur testées.

Facteurs	Paramètres		
	LF	LR	NRB
Génotypes (G)	7,697 <sup>***</sup>	6,442 <sup>***</sup>	3,140 <sup>*</sup>
Traitement hydrique (T)	747,208 <sup>***</sup>	443,667 <sup>***</sup>	99,524 <sup>***</sup>
Interaction (G x T)	2,101 <sup>ns</sup>	1,761 <sup>ns</sup>	0,288 <sup>*</sup>

ns : effet non significatif, \* : effet significatif  $p < 0,05$ , \*\* : effet hautement significatif  $p < 0,01$ , \*\*\* : effet très hautement significatif  $p < 0,001$ .

#### 1.4. Rapport des longueurs racinaires sur les longueurs foliaires (LR/LF)

Le rapport longueur racinaire sur la longueur foliaire varie en condition non limitante entre 0,92 chez DK et GGR et 0,72 chez B (Tableau.10.). En conditions stressantes ce rapport augmente avec la concentration du PEG-6000, à -0,6Mpa, il atteint un maximum de 1,31 (Tableau.10.). Ce qui implique que la partie aérienne est plus sensible à l'effet du PEG-6000 que la partie racinaire. L'effet du stress hydrique s'exprime par son incidence sur le pouvoir expansif des feuilles dont la croissance est plus limitée en raison de la diminution de l'absorption de l'eau par les racines.

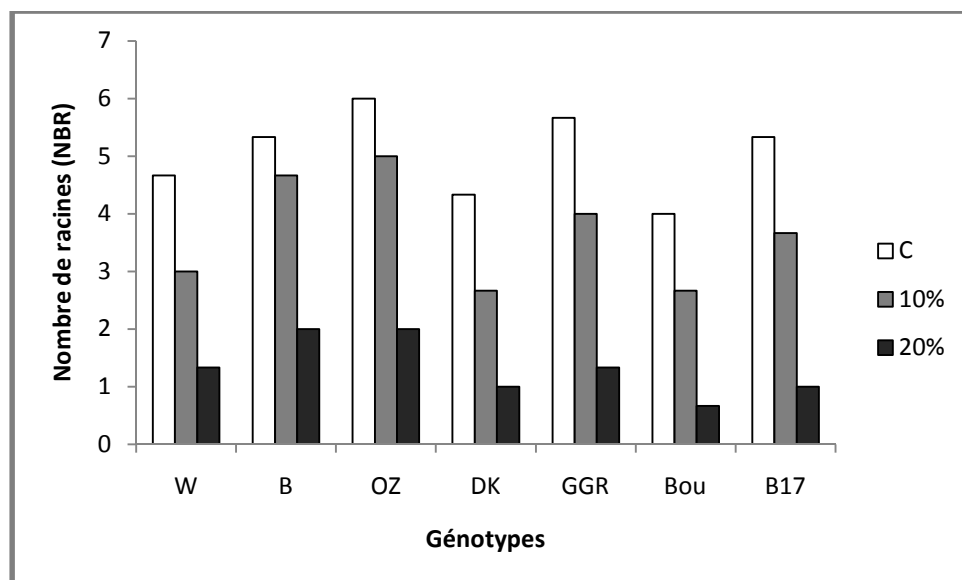
**Tableau.10.** Ratio longueur racinaire sur longueur foliaire (LR/LF).

Génotypes/Traitements	0MPa	-0,6MPa	-1,2MPa
W	0,91±0,01	1,31±0,18	-
B	0,72±1,35	0,73±0,02	1,91±0,04
OZ	0,83±0,05	0,84±0,01	1,91±0,05
DK	0,92±0,08	0,90±0,11	-
GGR	0,92±0,10	1,00±0,02	-
Bou	0,76±0,06	1,03±0,09	-
B17	0,85±0,05	1,01±0,02	-
moy	0,84	0,97	1,91

Les valeurs constituent les moyennes±SD.

### 1.5. Nombre de racines (NBR)

Les variations du potentiel osmotique induisent d'importantes réductions du nombre de racines par génotype testé. L'analyse de variance indique que l'interaction (Génotype x Traitement) est significative (Tableau.9.). Globalement, les résultats obtenus indiquent la présence de variations dans le nombre de racines apparues à travers les différents traitements hydriques.



**Figure.16.** Evolution de la longueur racinaire sous condition contrôle (C) et sous différentes conditions de stress hydrique (PEG-6000 à 10% et à 20%) chez les variétés de blé dur étudiées.

En condition contrôle (0MPa) le nombre de racines reste plus élevé avec une moyenne de 5 racines par plantule. En condition stressante, on observe des systèmes racinaires moins ramifiés et moins développés. A une pression osmotique de -0,6MPa, les génotypes exhibent des valeurs qui oscillent entre un maximum de 4 racines contre un minimum de 2 racines par plantule (Figure.16.). A -1,2MPa, le nombre des racines se limite à 2 racines par plantule (Figure.16.).

### Discussion

Le processus de germination constitue l'une des étapes clés de la croissance et du développement des plantes. La qualité d'élaboration du rendement dépend du bon déroulement de cette étape (Aleai et *al.*, 2010, Khayatnezhad et *al.*, 2010). Cette phase physiologique correspond à la transition de la phase de vie latente de la graine sèche à la phase de développement de la plantule (Anzala et *al.*, 2006).

La tolérance à la sécheresse pendant la phase de germination constitue un critère important, pour l'évaluation de l'aptitude des variétés de blé dur à tolérer un déficit hydrique, durant leur première phase de développement. Le procédé de germination consiste en une prise d'eau par la graine (imbibition) puis d'une élongation de l'embryon menant au final à l'apparition des racicules (Bewley et *al.*, 1997).

Selon nos résultats, plus la concentration du PEG-6000 augmente plus le pouvoir germinatif diminue. Les différences observées quant à la capacité de germination en présence des différentes pressions osmotiques peuvent s'expliquer par le fait que le PEG agit comme un agent osmotique, abaissant le potentiel hydrique du milieu. Une baisse du potentiel hydrique du milieu extérieur entraîne des difficultés, voire même une inhibition de la prise d'eau par la graine qui se répercute alors, sur le processus d'élongation de la racicule. Cette faible hydratation a pour conséquence un faible taux d'hydrolyse des réserves nutritives.

Khayatnezhad et Gholamin., (2011) ont noté un effet plus marqué du PEG sur la capacité de germination des graines de blé dur comparativement au NaCl, même à des pressions osmotiques équivalentes. De plus le pourcentage de germination tend à diminuer avec l'élévation du potentiel osmotique du milieu. Selon Yang et *al.*, (2009) une plus grande réduction du pourcentage de germination a été observée à des pressions osmotiques

supérieures à  $-0,6\text{MPa}$  chez des graines d'épicéa de Chine. Des effets similaires sur la diminution de la capacité de germination en présence de PEG ont été rapportés chez : le blé (Jajarmi., 2009), le maïs (Khayatnezhad et *al.*, 2010), le cotonnier (Kouakou et *al.*, 2008), l'arganier (Tazi et *al.*, 2003) et le millet (Radhouan., 2007).

Selon Ndaur et Danthu., (1998) les différences génotypiques observées, s'expliquent par le fait que la germination étant contrôlée aussi bien par des caractéristiques génotypiques que par les conditions environnementales. La germination, ainsi que l'émergence des racines en conditions de stress osmotique sont révélatrices, d'un potentiel génétique de tolérance au déficit hydrique au moins à ce stade de développement.

Le stress hydrique osmotique imposé a provoqué une réduction de la longueur et du nombre des racines, d'autant plus importante que le stress est sévère. Cette réduction peut être consécutive à un arrêt de la division et de l'élongation cellulaire au niveau des racines (Fraseur., 1990). Ceci entraînant une sorte de lignification du système racinaire, permettant aux plantes d'entrée dans une 'vie ralentie', probablement dans l'attente de conditions plus favorables (Vartanian., 1973). La sécheresse entraîne une réduction du potentiel hydrique autour des racines rendant ainsi l'assimilation de l'eau difficile (Bonhert et Shaveneva., 1998). Une assimilation qui se trouve être directement liée au degré de développement du système racinaire (Richard et Passioura., 1989) et qui se répercute également sur le bon développement du système végétatif des plantes.

Des effets similaires concernant l'impact du PEG sur le développement racinaire ont été rapportés, notamment par Ahmad et *al.*, (2009) à une concentration en PEG s'élevant à 20%. Azarnivand et *al.*, (2007) ont constaté une nette diminution de la longueur des racines à une pression de  $-1,2\text{Mpa}$  chez les graines d'armoise. Ces auteurs mettent en relief, un effet négatif très remarquable du stress hydrique, par le PEG sur la croissance de la racine. Selon Zandi Esfahan et *al.*, (2013) il existe une corrélation négative entre le niveau de stress hydrique appliqué et le pourcentage de germination, ainsi que la longueur des racines.

La longueur foliaire a également été influencée par les effets du PEG-6000. On observe une diminution plus marquée de la longueur du coléoptile, ainsi que de la longueur foliaire lorsque le déficit hydrique est d'autant plus élevé. Un stress hydrique durant le stade jeune plantule

peut inhiber le développement du coléoptile (Boubaker et Ymada., 1995). Selon Moud et Maghsoudi., (2008) un faible taux de croissance du coléoptile est associé à une faible aptitude à l'osmorégulation. De même qu'un stress sévère peut aussi entraîner un arrêt total du développement foliaire.

Le rapport des longueurs racinaires sur les longueurs foliaires a augmenté avec la concentration du PEG-6000, indiquant ainsi une plus grande sensibilité de la partie aérienne. En effet, une diminution de la pression osmotique du milieu extérieur va empêcher l'absorption de l'eau par le système racinaire. Ceci ayant pour conséquence une réduction de la croissance de l'appareil végétatif comme l'ont rapporté Tazi et *al.*, (2003). Des effets similaires ont été remarqués concernant une plus grande diminution de la croissance de la partie aérienne en présence de PEG chez l'orge (Oukarroum., 2007), ainsi que chez le cotonnier (Kouakou et *al.*, 2008). Selon Bowley et Black., (1994) le déficit hydrique affecte négativement la croissance végétale. La diminution de la croissance de la partie aérienne peut s'accompagner d'une réduction au niveau de la production des feuilles (Tazi et *al.*, 2003). Harrouni et *al.*, (1995) corroborent ces observations et expliquent que la croissance végétale et donc l'expansion des feuilles peut être sévèrement affectée par le stress. Un effet qui s'exprime par un ralentissement progressif puis rapide de la croissance primaire, puisque le déficit hydrique réduit la turgescence et, par conséquent, le pouvoir expansif des feuilles.

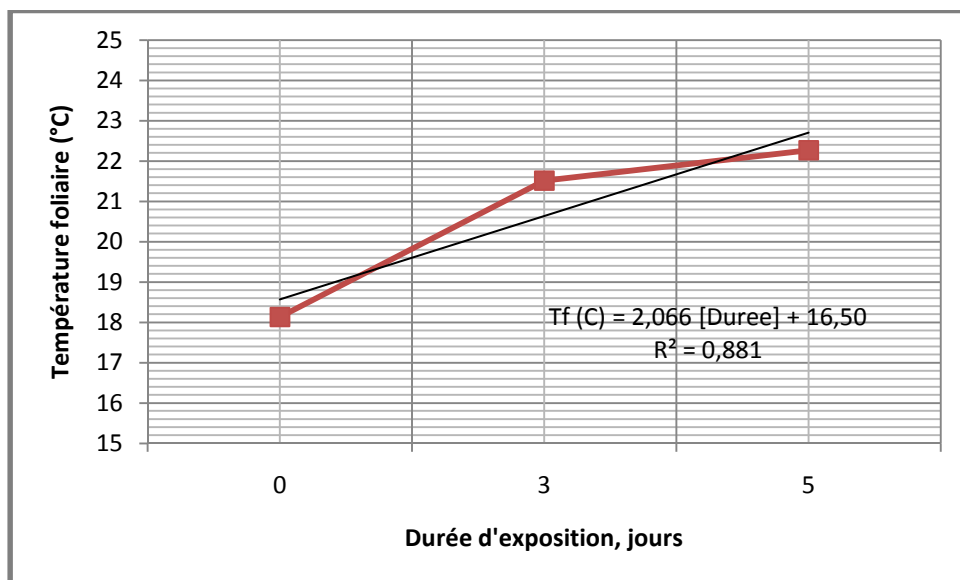
La présence de variations dans les attributs physiologiques en réponse à l'induction du stress, représente un phénomène communément observé et peut-être en accord avec le degré de tolérance de la plante (George et *al.*, 2013).

## 2. Effet du déficit hydrique osmotique induit par le polyéthylène glycol-6000

### 2.1. Evolution de la température foliaire

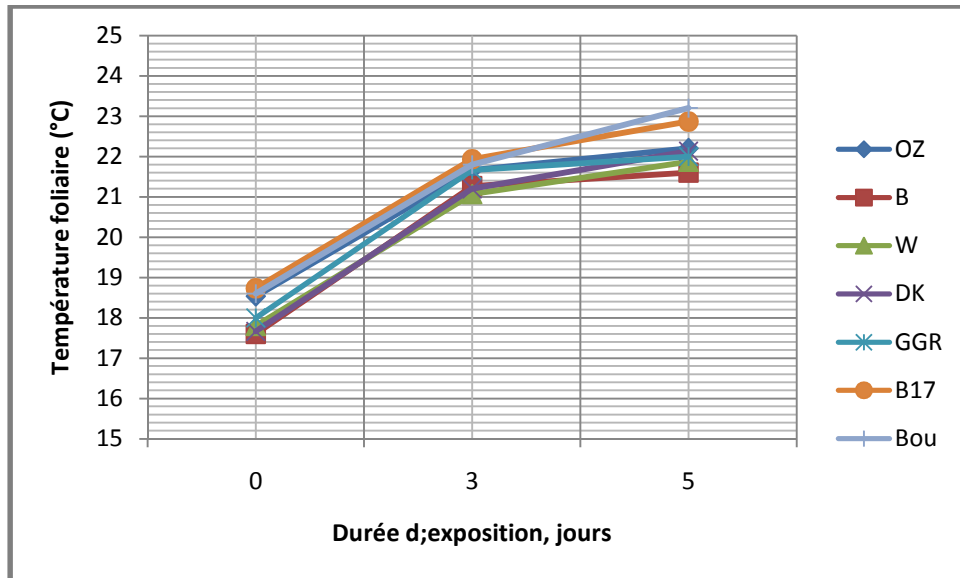
La température foliaire figure au rang des paramètres biophysiques les plus utilisés pour la détection du stress hydrique. En conditions non limitantes, les températures foliaires observées, chez l'ensemble des variétés étudiées sont considérées comme étant relativement basses. De plus on ne décèle pas de distinction notable entre les différentes variétés, les valeurs observées sont quasi équivalentes et du même ordre (de 17.6 °C à 18.7°C).

En conditions limitantes, on observe une augmentation de la température foliaire, mais qui reste tout de même modérée. Là encore, on ne remarque pas de différence très prononcée entre variétés. Après trois jours de stress à une concentration de 10% de PEG-6000, la valeur maximale était de 21.7°C chez B17. Après cinq jours de stress, elle atteint les 23.2°C chez Bou (Figure.17.). Quant au traitement à 20% de PEG-6000, les valeurs moyennes vont de 22.5°C après trois jours de stress à de 23°C après cinq jours de stress. Bien que la contrainte hydrique osmotique imposée ait entraîné à la fin de chaque traitement une augmentation des températures foliaires, par comparaison aux plantes contrôlées, cette augmentation reste tout de même peu marquée. On constate que l'écart, entre les températures foliaires des plantes témoins et celles des plantes stressées, demeure faible que ce soit en fonction du traitement appliqué au PEG-6000 ou en fonction de la durée de son application (Figure.18.).



**Figure.17.** Effet de la durée d'exposition au PEG à 10% sur la température foliaire (moyenne des sept variétés étudiées).





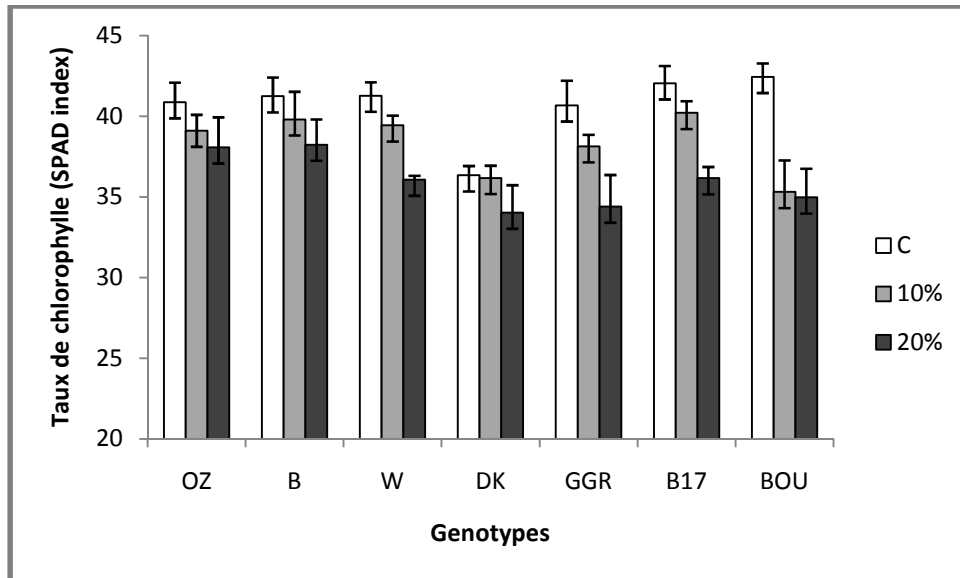
**Figure.18.** Variation de la température foliaire des sept variétés de blé dur étudiées en fonction de la durée d'exposition (en jours) au PEG à 10%.

Au terme de l'application du stress osmotique, l'analyse de variance révèle des différences significatives pour l'effet traitement, l'effet génotype et l'effet durée (Tableau.11.). Par contre l'effet interaction (Génotype x Traitement), (Génotype x Durée) et (Génotype x Traitement x Durée) n'est pas significatif (Tableau.11. et Tableau.13.). Ceci implique que les différences observées sont indépendantes de la concentration en PEG et de la durée d'exposition.

## 2.2. Evolution de la teneur en chlorophylle totale (SPAD index)

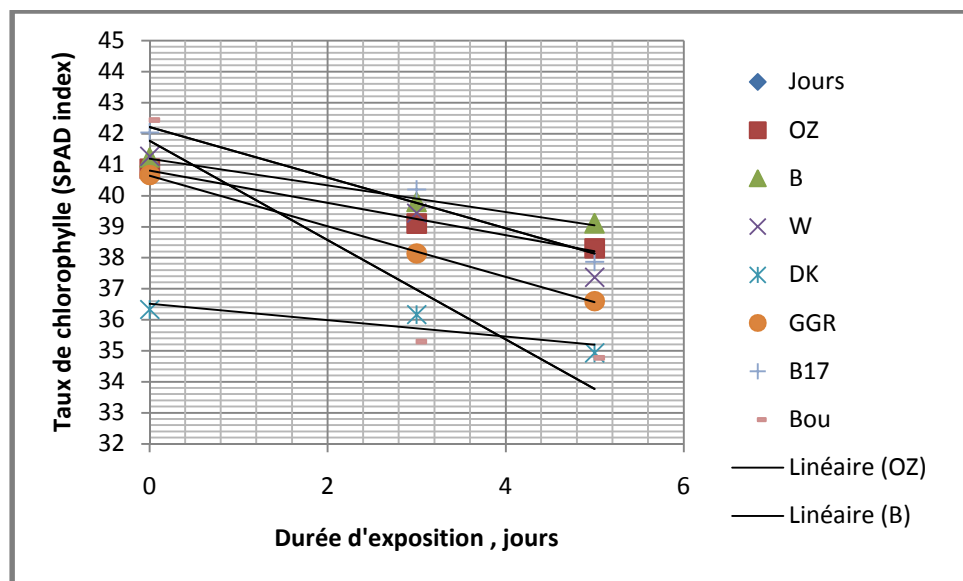
La variation du taux de chlorophylle apporte également une information, concernant le comportement des différentes variétés, vis-à-vis de l'application du stress osmotique par le biais du PEG-6000. Ce paramètre constitue un bon indicateur des performances physiologiques des plantes.

Sous condition de bonne alimentation hydrique, on note que les teneurs en chlorophylle totales ou index SPAD ne varient pas de manière considérable, pour l'ensemble des génotypes testés, à l'exception de la variété DK qui présente la plus faible valeur. Les valeurs observées oscillent entre un maximum de (42 unités SPAD) enregistré chez la variété (B17) et un minimum de (36 unités SPAD) enregistré chez la variété (DK) (Figure.19.).



**Figure.19.** Evolution du taux de chlorophylle sous condition contrôle (C) et sous condition de stress hydrique osmotique (10% et 20% de PEG) des différentes variétés de blé dur durant trois jours. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$ SD, n=3.

Le déficit hydrique osmotique affecte significativement la teneur en chlorophylle. En effet, on note que suite à l'application de la contrainte hydrique, le contenu en chlorophylle des feuilles baisse chez les plantes stressées. Après trois jours de déficit hydrique par traitement au PEG-6000 sous une pression osmotique de -0,6MPa, on relève une diminution du taux de chlorophylle par rapport aux contrôles (Figure.19.); une réduction qui tend à s'accroître après cinq jours de stress. Les valeurs minimales enregistrées sont de 38.3 unités SPAD et 36.9 unités SPAD respectivement. Un traitement au PEG-6000 à -1,2MPa induit une plus grande réduction du contenu en chlorophylle, les valeurs passent de 35.9 unités SPAD après trois jours de stress à 34.6 unités SPAD après cinq jours de stress (valeurs moyennes). Toutefois, la réduction du contenu en chlorophylle diffère entre variétés, dans la mesure où elle n'accuse pas les mêmes écarts pour chaque variété. Les variétés DK, GGR et Bou ont tendance à présenter les valeurs les plus basses. Une réduction qui est d'ailleurs plus marquée à mesure que l'intensité du stress ainsi que la durée d'exposition augmentent (Figure.20.). Tandis que les variétés OZ et B présentent les taux de réduction les plus faibles.



**Figure.20.** Effet de la durée d'exposition au PEG à 10% sur le taux de chlorophylle (SPAD index) des sept variétés de blé dur étudiées.

Le taux de chlorophylle estimé par l'index SPAD, indique qu'il existe une différence significative dans la variation du taux de chlorophylle, entre les plantes témoins et les plantes stressées. Le stress osmotique à  $-0,6\text{MPa}$ , de même que celui à  $-1,2\text{MPa}$ , influence significativement les teneurs en chlorophylle (Tableau.11.). Les variétés étudiées possèdent un plus grand degré de sensibilité au stress osmotique à  $-1,2\text{MPa}$  avec un taux de réduction de  $(-1,245)$  contre  $(-0,744)$  à  $-0,6\text{MPa}$ . L'étude de l'interaction (Génotype x Durée) indique que le taux de chlorophylle diminue significativement en fonction de la durée d'exposition au PEG (Tableau.11., Figure.20.).

### 2.3. Evolution de la matière sèche

En conditions contrôles, la teneur en matière sèche est significativement plus importante en comparaison aux conditions stressantes. L'interaction (Génotype x Traitement) est significative, de ce fait les variétés diffèrent dans leur réponse vis-à-vis du stress hydrique pour ce paramètre. Il est en est de même pour leur réponse vis-à-vis de la durée d'exposition, interaction (Génotype x Durée) significative (Tableau.11.) ainsi que de l'interaction (Génotype x Traitement x Durée) (Tableau.13.).

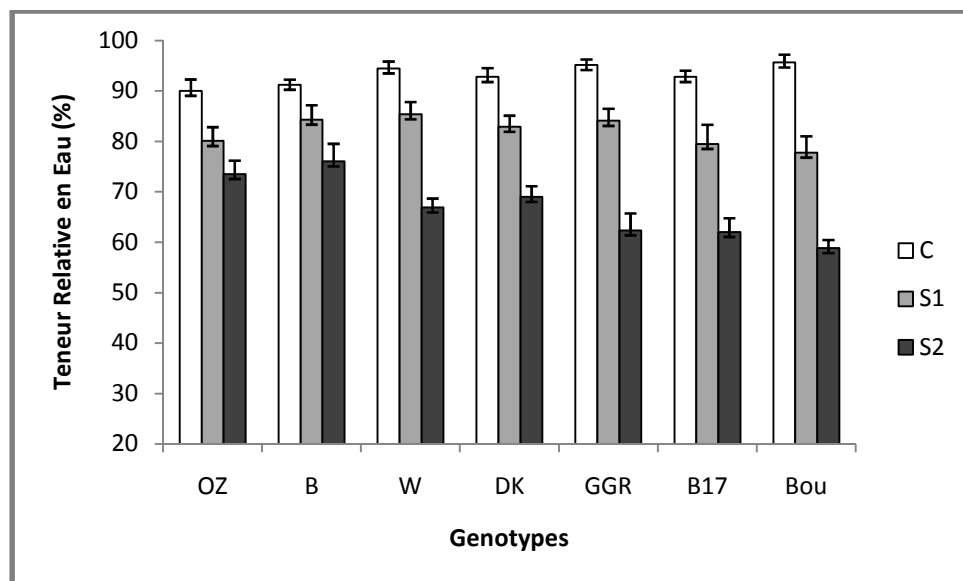
L'application de la contrainte hydrique osmotique a entraîné une réduction du poids sec. Le pourcentage de réduction du poids sec enregistré chez les plantes stressées n'a pas été affecté

de manière similaire pour les deux traitements. L'effet du PEG-6000 s'est traduit par une augmentation significative du taux de réduction de la matière sèche aérienne et racinaire. Les résultats obtenus montrent une différence dans le poids sec des parties aériennes et racinaires. Ce poids varie en fonction des variétés. Selon le test de Newman et Keuls au seuil de 5% la variété GGR se classe en premier avec la plus importante valeur de matière sèche avec 13,9g, la dernière valeur a été donnée par la variété Bou avec 7,8g à -0,6MPa et par la variété B17 avec 6,06g à -1,2MPa. Ces résultats restent en accords avec ceux de Zhang et *al.*, (2003) et Bousbaa., (2006) et indiquent que plus le stress devient sévère, plus la production de matière sèche ralentit.

#### 2.4. Evolution de la teneur relative en eau

En condition optimum de bonne alimentation hydrique, on ne décèle pas de différences notables concernant les valeurs de la teneur relative en eau des feuilles (RWC, Relative Water Content) relevées chez les géotypes testés. Ces derniers présentent des valeurs de l'ordre de (90,03% à 95,6%) durant la période expérimentale (Figure.21.). Ces valeurs restent compatibles avec un statut de plantes non stressées et ne varient pas de manière très marquée entre géotypes.

On observe une diminution de la teneur relative en eau des feuilles suite à l'application de la contrainte hydrique osmotique. Au terme de trois jours de stress à -0,6MPa, la TRE varie entre 89% et 81%. Après cinq jours de stress, la TRE varie entre 85% et 77%. Suite à l'application d'une pression osmotique de -1,2MPa pour trois jours, les valeurs des TRE se voient varier entre un maximum de 78% chez OZ et un minimum de 71% chez GGR. Une diminution qui a tendance à augmenter après cinq jours de stress, avec un maximum de 76% chez la variété B et un minimum de 58% chez la variété Bou (Figure.21.).



**Figure.21.** Evolution de la teneur relative en eau sous condition contrôle (C) et sous conditions de stress hydrique osmotique (10% et 20% de PEG) des différentes variétés de blé dur durant cinq jours. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$ SD, n=3.

L'application d'une contrainte hydrique osmotique par addition de PEG-6000 entraîne à la fin de chaque traitement, une baisse significative des TRE chez l'ensemble des génotypes, mais à des degrés variés.

**Tableau.11.** Carrés moyens de l'analyse de variance de la teneur relative en eau (TRE), du taux de chlorophylle (SPAD index), de la température foliaire (Tf) et de la matière sèche (MS) des variétés de blé dur testées à 0MPa et à -0,6MPa et mesurés à trois dates.

Facteurs	Paramètres			
	TRE	SPAD index	Tf	MS
Génotypes (G)	27,451**	19,436***	1,609 <sup>ns</sup>	6,074***
Traitement hydrique (T)	264,076***	79,842***	196,625***	26,846***
Durée (D)	1324,280***	52,807***	101,136***	15,657***
Interaction (G x T)	21,532**	5,794***	0,073 <sup>ns</sup>	1,511**
Interaction (G x D)	11,154*	4,042***	0,128 <sup>ns</sup>	1,106***

ns : effet non significatif, \* : effet significatif  $p < 0,05$ , \*\* : effet hautement significatif  $p < 0,01$ , \*\*\* : effet très hautement significatif  $p < 0,001$ .

L'analyse de variance a révélé des différences significatives concernant l'effet interaction (Génotype x Traitement) et (Génotype x Durée) (Tableau.11.). Ainsi le stress osmotique affecte significativement la diminution de la teneur relative en eau et ce pour les deux traitements. La teneur relative en eau a été d'autant plus faible que le stress hydrique a été plus sévère et plus prolongé. Autant la variabilité génotypique que l'effet interaction (Génotype x Traitement) observés dans notre étude pour ce caractère trouvent leur confirmation dans différents travaux antécédents. Selon Molnar *et al.*, (2004) un traitement au PEG entraîne une diminution des TRE, une diminution qui devient plus accentuée à des pressions osmotiques supérieures à -0,7MPa. Pour ce paramètre l'interaction (Génotype x Traitement x Durée) est également significative (Tableau.13.).

## 2.5. Détection et évolution de quelques paramètres biochimiques

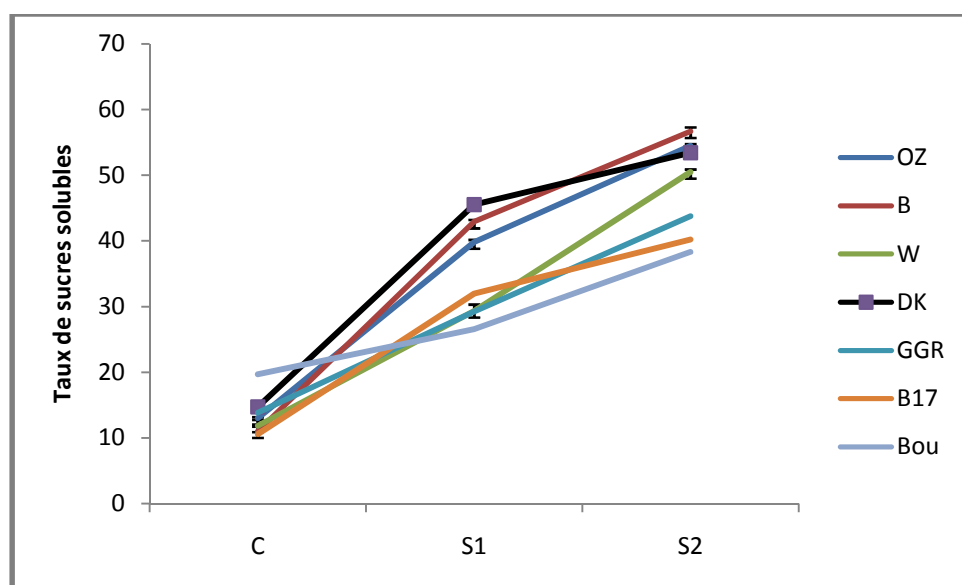
### 2.5.1. Evolution des teneurs en sucres solubles

Les teneurs en sucres solubles augmentent significativement avec le degré du stress imposé chez les génotypes étudiés. Les valeurs enregistrées varient d'une manière prononcée entre génotypes et entre traitements.

En conditions contrôles, les plantes témoins affichent des teneurs en sucres solubles plutôt basses et variables. La variété B17 présente l'accumulation en sucre la plus basse avec 10,6µg/100mg de MF, par opposition à l'accumulation la plus élevée, enregistrée chez Bou avec 19,6µg/100mg de MF.

Sous une pression osmotique de -0,6MPa après trois jours de stress, on observe une augmentation des teneurs en sucres solubles, la variété Bou enregistre la plus faible valeur avec 26,5µg/100mg de MF, alors que la variété DK enregistre la valeur la plus élevée avec 45,5µg/100mg de MF. Après cinq jours de stress, la valeur minimale passe à 38,2µg/100mg de MF tandis que la valeur maximale passe à 56µg/100mg de MF (Figure.22.). Le traitement au PEG-6000 à -1,2MPa accentue cette augmentation des teneurs en sucres solubles. Les valeurs moyennes observées sont de 39,9µg/100mg de MF, après trois jours de stress et de 48,1µg/100mg de MF après cinq jours de stress (Figure.22.). L'accumulation en sucres solubles chez les plantes stressées a été plus affectée par le déficit osmotique à -1,2MPa.

L'effet de la pression osmotique à ce niveau s'est traduit par une hausse significative, plus accentuée du taux d'accumulation des sucres solubles, en particulier pour certains géotypes. En effet, les teneurs en sucres solubles varient en fonction des variétés. Ces teneurs atteignent des proportions plus élevées chez DK, B et OZ, variétés présentant une plus grande capacité à accumuler les sucres (Figure.22.).



**Figure.22.** Variation de la teneur en sucres des sept variétés de blé dur étudiées en fonction de la concentration en PEG (0, 10 et 20%) sur une durée de cinq jours.

**Tableau.12.** Carrés moyens de l'analyse de variance de la teneur en sucre (Suc) des variétés de blé dur testées à 0MPa et -0,6MPa et mesurée à trois dates.

Facteurs	Teneur en sucres
Génotypes (G)	62,561 <sup>***</sup>
Traitement hydrique (T)	2339,727 <sup>***</sup>
Durée (D)	1956,039 <sup>***</sup>
Interaction (G x T)	86,626 <sup>*</sup>
Interaction (G x D)	74,025 <sup>***</sup>

ns : effet non significatif, \* : effet significatif  $p < 0,05$ , \*\* : effet hautement significatif  $p < 0,01$ , \*\*\* : effet très hautement significatif  $p < 0,001$ .

**Tableau.13.** Carrés moyens de l'analyse de variance, pour l'interaction (Génotype x Traitement x Durée, de la teneur relative en eau (TRE), de la température foliaire (Tf), de la teneur en chlorophylle (SPAD) de la matière sèche (MS) et de la teneur en sucres solubles (Suc) des variétés de blé dur testées.

Facteur	Paramètres				
	TRE	Tf	SPAD	Suc	MS
Génotype x Traitement x Durée (G x T x D)	16,12 <sup>**</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	0,62 <sup>ns</sup>	35,27 <sup>**</sup>	0,28 <sup>**</sup>

ns : effet non significatif, \* : effet significatif  $p < 0,05$ , \*\* : effet hautement significatif  $p < 0,01$ , \*\*\* : effet très hautement significatif  $p < 0,001$ .

L'imposition des différents traitements au PEG-6000, entraîne une augmentation des teneurs en sucres solubles. Cette augmentation est plus marquée à une pression osmotique de -1,2MPa. Fait également rapporté par Mohammadkhani et Heidar., (2008) qui ont noté que l'accumulation des sucres solubles au niveau des feuilles est beaucoup plus accentuée à des pressions osmotiques excédant les -0,47MPa. L'étude de l'interaction (Génotype x Traitement) et (Génotype x Durée) est significative, ce qui signifie que les différences entre variétés dépendent aussi bien de la concentration en PEG-6000, que de la durée d'exposition (Tableau.12.).

### 2.5.2. Profils électrophorétiques 1D SDS-PAGE des protéines thermostables foliaires

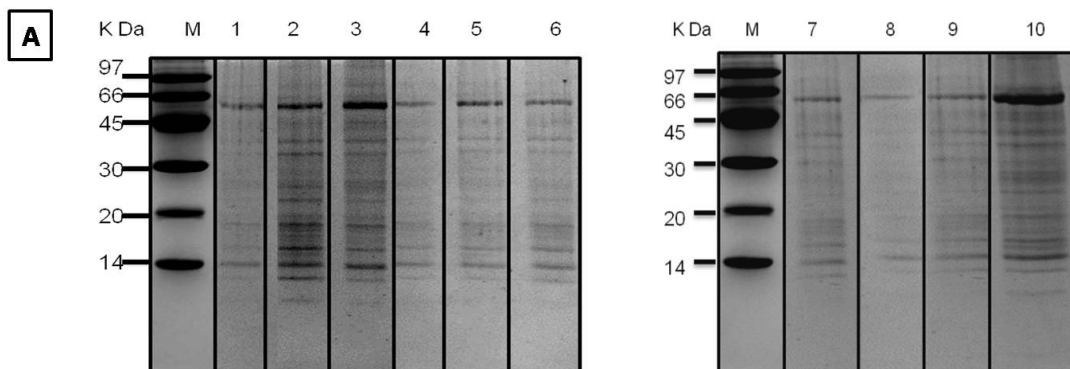
Dans l'optique de mieux comprendre les bases moléculaires de la protéomique de la tolérance à la sécheresse, des analyses en 1D-SDS-PAGE ont été réalisées ; en ayant pour but l'identification des profils d'expression des protéines thermostables impliquées dans la réponse au déficit hydrique. Les protéines thermostables ont été extraites à partir des feuilles de plantes contrôles et de plantes stressées, traitées avec 10 et 20% de PEG-6000 durant 3 et 5 jours.

Les profils protéiques révèlent des différences, entre les conditions contrôles et les conditions de stress hydrique induites par le PEG-6000. Globalement les cultivars étudiés présentent un pattern relativement similaire, à savoir que l'accumulation des protéines thermostables augmente au niveau des feuilles, de l'ensemble des variétés testées en présence de PEG-6000. Toutefois, il existe des différences en terme d'intensité et de bandes protéiques révélées. Un total de 114 bandes protéiques, tous traitements confondus, ont été révélées avec des masses molaires allant de 14 à 106.8KDa.

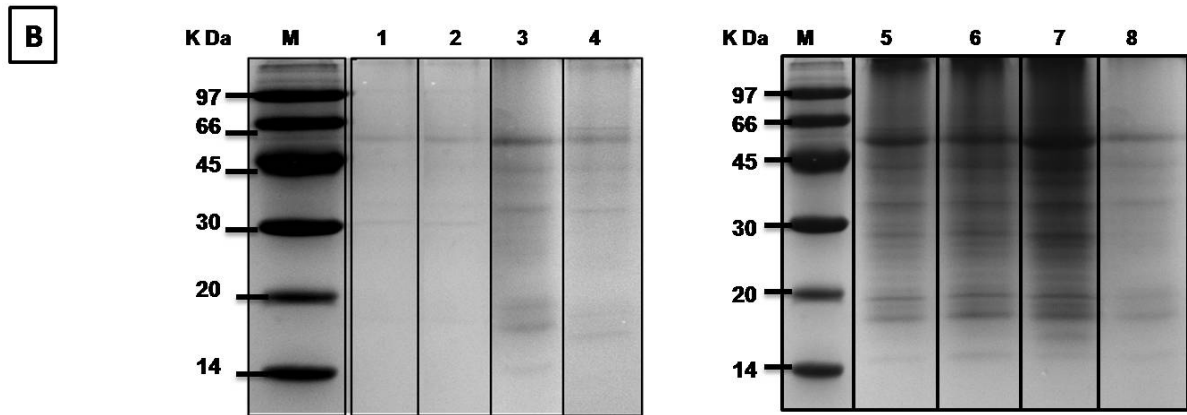


En conditions standards, les protéines thermostables (DHN) s'accumulent à moindre mesure, comparativement aux conditions stressantes; une différence qui englobe également l'intensité des bandes révélées. Parmi les protéines thermostables observées, la protéine de faible poids moléculaire de 14KDa, exhibe une intensité plus élevée au niveau des feuilles des plantes stressées, plus particulièrement chez les variétés W et B (Figure.23.A). Une observation qui se trouve être en accord avec celle de Vaseva et *al.*, (2010). De plus l'intensité des bandes protéiques révélées entre 66 et 24KDa ainsi qu'entre 20 et 14KDa, apparaît comme ayant augmentée chez les plantes stressées. Ces dernières, même lorsqu'elles sont détectées chez les contrôles, elles sont d'une intensité beaucoup plus faible.

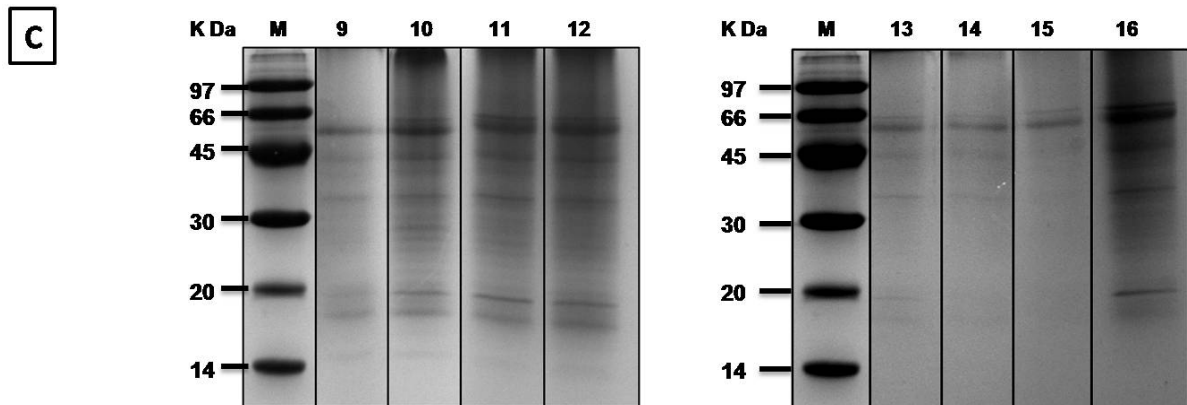
Les bandes protéiques observées ont été détectées, au terme de trois jours d'exposition au PEG-6000 à 10% et deviennent plus marquées chez certaines variétés telles que B après addition de 20% de PEG-6000. Après cinq jours d'exposition au PEG-6000, on note l'accumulation de 14, 16, 17, 21, 26, 46,60, 68, 87Kda chez B, mais aussi l'accumulation de 26, 28, 29, 30, 33, 45, 85, 101, 106KDa (PM) chez l'ensemble des génotypes testés (Figure.23.). Considérant les deux niveaux de stress, on note l'accumulation de 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 29,30, 41, 44, 45, 46, 53, 68, 69, 84, 85, 106KDa (PM) (Figure.23.A.B.C.D.). Ces protéines sont détectées chez B à partir du troisième jour d'application du stress, alors qu'elles n'apparaissent, voire pas du tout, qu'après cinq jours de stress chez W, DK, GGR, B17 et Bou. De plus en condition de stress sévère, le nombre et l'intensité des bandes protéiques révélées diminuent considérablement pour certaines variétés telles que B17, GGR et Bou.



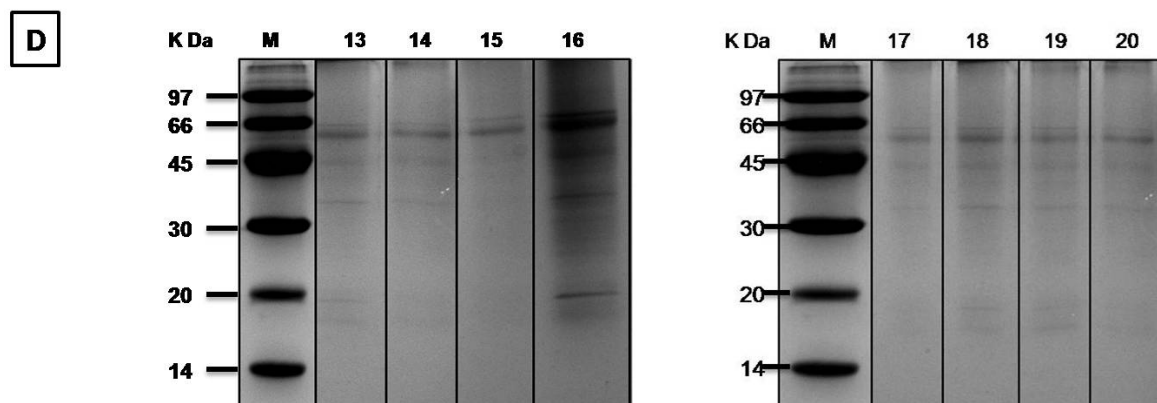
**Figure.23.A.** Profil en 1D SDS-PAGE des protéines thermostables de variétés de blé dur extraites à partir des feuilles, sous différentes conditions de stress. (A): (Lignes 1 à 3, B): 1= témoin, 2= PEG 10% 3jours, 3= PEG 10% 5jours. (Lignes 4 à 7, W): 4= témoin, 5= PEG 10% 3jours, 6=PEG 10% 5jours. (Lignes 7 à 8, W): 7= PEG 20% 3jours, 8= PEG 20% 5jours. (Lignes 9 à 10, B): 9= PEG 20% 3jours, 10= PEG 20% 5jours. . M: Marqueur de taille (poids moléculaire en KDa).



**Figure.23.B.** Profil en 1D SDS-PAGE des protéines thermostables de variétés de blé dur extraites à partir des feuilles, sous différentes conditions de stress. **(B)**: (Lignes 1 à 4, témoins): 1= B17, 2= GGR, 3= DK, 4= Bou. (Lignes 5 à 8, PEG 10% 3jours): 5= B17, 6= GGR, 7= DK, 8= Bou.



**Figure.23.C.** Profil en 1D SDS-PAGE des protéines thermostables de variétés de blé dur extraites à partir des feuilles, sous différentes conditions de stress. **(C)**: (Lignes 9 à 12, PEG 10% 5jours): 9= B17, 10= GGR, 11= DK, 12= Bou. (Lignes 13 à 16, PEG 20% 3jours): 13= GGR, 14= B17, 15= Bou, 16= DK.



**Figure.23.D.** Profil en 1D SDS-PAGE des protéines thermostables de variétés de blé dur extraites à partir des feuilles, sous différentes conditions de stress. **(D)**: (Lignes 17 à 20, PEG 20% 5 jours): 17= B17, 18= GGR, 19= DK, 20= Bou.

Nos résultats indiquent que l'expression des protéines thermostables foliaires est génétiquement régulée, en étant dépendante à la fois de la concentration en PEG, de la durée d'exposition ainsi que des différences génétiques existantes entre génotypes.

### 3. Effet du déficit hydrique induit par l'arrêt de l'arrosage

#### 3.1. Evolution de la conductance stomatique

Les mesures effectuées, à l'aide du prometteur à diffusion de vapeur d'eau représentent les valeurs de la résistance stomatique ( $r_s$ ), cette dernière est inversement proportionnelle à la conductance stomatique ( $g_s$ ). Ceci implique que plus les valeurs de la résistance stomatique seront élevées, plus les valeurs de la conductance stomatique seront basses.

En condition non déficitaire, les différentes variétés présentent des conductances stomatiques supérieures à celles des plantes stressées, traduisant leur aptitude à effectuer une transpiration favorable en raison d'une bonne alimentation hydrique. La variété B17 présente la valeur la plus élevée avec ( $154,66 \text{ mmole m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), par opposition à la variété GGR possédant la valeur la plus faible avec ( $79,33 \text{ mmole m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Au terme de l'application d'un déficit hydrique de deux semaines, la conductance stomatique des feuilles a baissé pour les plantes stressées, montrant ainsi une réduction de la transpiration due au manque d'eau. Les valeurs enregistrées varient entre un minimum de ( $19,85 \text{ mmole m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) chez GGR et un maximum de ( $33 \text{ mmole m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) chez OZ. Les plantes soumises à la

contrainte hydrique réduisent leur conductance stomatique, ce qui traduit une fermeture des stomates, afin de préserver l'eau dans leurs tissus et éviter leur déshydratation.

La réduction des valeurs de la ( $g_s$ ) diffère d'une manière significative entre les variétés étudiées. En effet, la comparaison des moyennes ainsi que l'analyse de variance indiquent qu'il existe une différence très hautement significative pour l'effet stress, l'effet variété et l'effet interaction (Génotype x Traitement) (Tableau.14.). Ces différences significatives indiquent que les variétés testées réagissent différemment à la contrainte hydrique, en terme de réduction de la conductance stomatique. Galmes et *al.*, (2007), Rizza et *al.*, (2012) ainsi que April et *al.*, (2013) ont également rapportés un effet significatif du déficit hydrique sur la diminution de la conductance stomatique.

**Tableau.14.** Carrés moyens de l'analyse de variance de la conductance stomatique ( $g_s$ ) des variétés de blé dur testées.

Traitements	Conductance stomatiques ( $g_s$ )
Génotypes (G)	1548,914 * **
Traitement hydrique (T)	79784,522 ***
Interaction (G x T)	1225,093 ***

ns : effet non significatif, \* : effet significatif  $p < 0,05$ , \*\* : effet hautement significatif  $p < 0,01$ , \*\*\* : effet très hautement significatif  $p < 0,001$ .

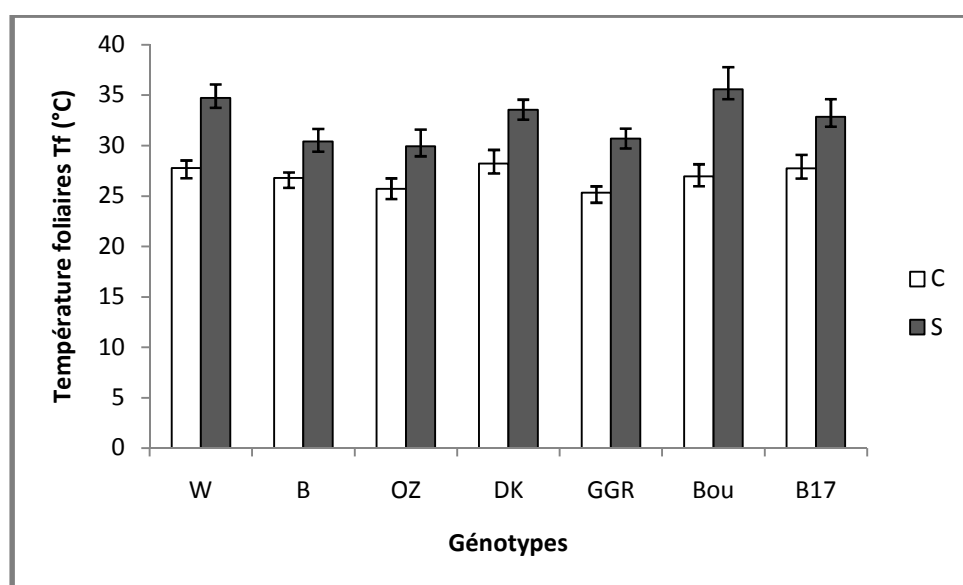
### 3.2. Evolution de la température foliaire

Les données recueillies à l'aide du thermomètre infrarouge, pour l'essai sous serre, en condition de bonne alimentation hydrique révèlent des températures foliaires basses ; mais qui demeurent plus élevées que celles recueillies pour l'essai en chambre de culture. Les températures foliaires enregistrées varient entre 25,33°C et 28,3 °C (Figure.24.).

Suite à l'application de la contrainte hydrique, les valeurs moyennes enregistrées augmentent et passent de 26,93°C pour les témoins à 32,54°C pour les stressés. Au terme des deux semaines de stress, on enregistre une température maximale de 34,4°C pour Bou et une température minimale de 29,9°C pour OZ (Figure.24.). Le déficit hydrique a causé une augmentation significative des températures foliaires et son effet diffère selon les variétés. Avec le manque d'eau subit par les plantes en condition stressante, ces dernières ne disposent

pas de la même éventualité de rafraîchir leur feuille via la vapeur d'eau comme c'est le cas pour les plantes témoins. Les différences observées pour cette expérimentation sont plus accentuées que lors de l'expérimentation précédente. Ce constat pourrait être lié à l'incidence de l'ensoleillement et de la chaleur dont les effets peuvent être plus visibles en serre.

L'analyse de variance effectuée sur les valeurs des températures foliaires indique des différences significatives au niveau variété, dans la mesure où l'augmentation accusée pour les valeurs observées n'est pas la même pour toutes les variétés (Tableau.16.). Des différences significatives apparaissent également concernant l'interaction (Génotype x Traitement), ce qui implique que les variétés étudiées répondent différemment au stress hydrique pour ce paramètre et que leur réponse varie en fonction du stress imposé.



**Figure.24.** Evolution des températures foliaires sous condition contrôle (C) et sous conditions de stress hydrique (S) des différentes variétés de blé dur. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$ SD, n=3.

### 3.3. Evolution de la teneur en chlorophylle totale

Le taux de chlorophylle estimé par les valeurs de SPAD index indique qu'au terme de la deuxième semaine d'imposition du déficit hydrique, le contenu en chlorophylle a baissé. Par opposition, les feuilles des plantes contrôles exhibent un taux en chlorophylle élevé. Les proportions de l'index SPAD diffèrent selon les variétés, avec des valeurs moyennes de 40,28

unités SPAD respectivement pour les témoins et de 35,89 unités SPAD pour les stressés. Les variétés B et OZ présentent les valeurs les plus hautes (Tableau.15.).

L'écart constaté entre les deux traitements (irrigué et non irrigué) est significatif (Tableau.14.). L'analyse de variance révèle des différences significatives entre traitements et entre variétés, ainsi le stress hydrique imposé aux plantes influence leur teneur en chlorophylle. Dans le calcul des valeurs de SPAD index, le chlorophylle mètre fait appel au ratio de réflectance entre le rouge (650nm) et le proche de l'infrarouge (950nm). Une différence significative dans la variation de la concentration en chlorophylle impliquerait que le niveau de stress hydrique appliqué au cours de l'expérimentation affecte de façon significative, la réflectance des plantes dans ces deux longueurs d'onde.

Selon Silva *et al.*, (2007), l'effet du manque d'eau sur la diminution du taux de chlorophylle varie entre variétés en fonction de leur degré de tolérance au stress hydrique. Fait appuyé par diverses études (Guo *et al.*, 2009 ; Parwata *et al.*, 2012 ; Bousbaa *et al.*, 2013).

**Tableau.15.** Evolution du contenu en chlorophylle (SPAD index) sous condition contrôle (C) et sous condition de stress hydrique (S) des différentes variétés de blé dur.

	SPAD index	
Génotypes/Traitements	Contrôle (C)	Stressé (S)
W	40,23±1,27	35,36±1,26
B	41,06±2,25	37,87±1,62
OZ	41,66±1,75	38,33±0,75
DK	35,90±2,26	33,73±1,13
GGR	40,10±1,89	35,03±2,17
Bou	39,06±1,62	32,29±1,61
B17	44,00±1,04	38,66±0,87
moy	40,28	35,89

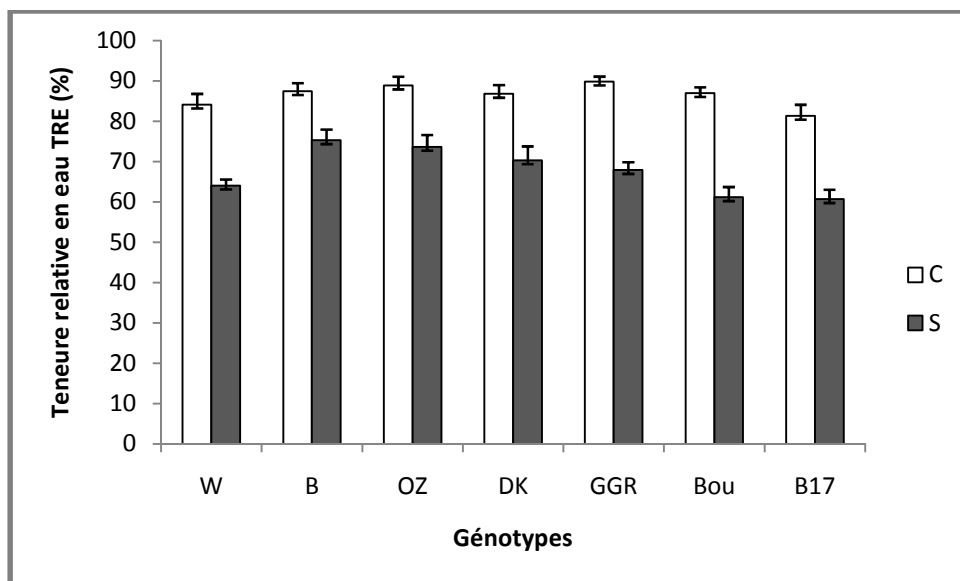
Les valeurs représentent les moyennes±SD.

### 3.4. Evolution de la teneur relative en eau

En condition optimum de bonne alimentation hydrique, on ne décèle pas de grandes différences, concernant les valeurs de la teneur relative en eau, relevées à partir des feuilles des géotypes testés. Ces derniers présentent des valeurs de l'ordre de (89,87% à 81,35%) respectivement pour les variétés GGR et B17 (Figure.25.). Tout comme pour l'expérimentation précédente ces valeurs restent compatibles avec un statut de plantes non stressées.

Au terme de deux semaines de déficit hydrique, la TRE varie entre (75,29%) pour le géotype B et (60,70%) pour le géotype B17 (Figure.25.). L'application d'une contrainte hydrique entraîne à la fin du traitement, une diminution significative de la TRE. Toutefois cette baisse demeure variable, certains géotypes semblent être plus affectés par la contrainte hydrique, en accusant des pertes considérables de leur turgescence relative. Il se pourrait que la capacité des plantes à survivre au déficit hydrique dépende de leur capacité à limiter les pertes en eau et à maintenir un statut hydrique favorable, après que les stomates aient atteint leur ouverture minimum.

L'analyse de variance confirme qu'il existe une diminution significative de la TRE des plantes stressées, suite à l'arrêt de l'apport en eau. Cette réduction diffère de façon significative entre variétés (Tableau.16.). Quant à l'effet interaction (Géotype x Traitement), il s'avère tout aussi significatif, ce qui implique que les variétés étudiées réagissent différemment au stress (Tableau.16.). Certaines variétés possédant une meilleure capacité à préserver leur statut hydrique et à limiter les pertes de leur turgescence. Ce qui leur confère une meilleure aptitude à tolérer le stress.



**Figure.25.** Evolution des teneurs relatives en eau sous condition contrôle (C) et sous condition de stress hydrique (S) des différentes variétés de blé dur. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$ SD, (n=3).

Ces résultats sont corroborés par ceux rapportés par d'autres investigations à savoir que ; la contrainte hydrique entraîne une diminution significative de la TRE. Une réduction qui va dépendre de la sensibilité du génotype vis-à-vis du stress (Talamè et *al.*, 2006 ; April et *al.*, 2013 ; Melloul et *al.*, 2014). Selon des études précédentes plus le génotype est tolérant au stress hydrique, plus il tend à maintenir des TRE élevées en conditions déficitaires (Nouri., 2002 ; Atteya., 2003 ; Parwata et *al.*, 2013).

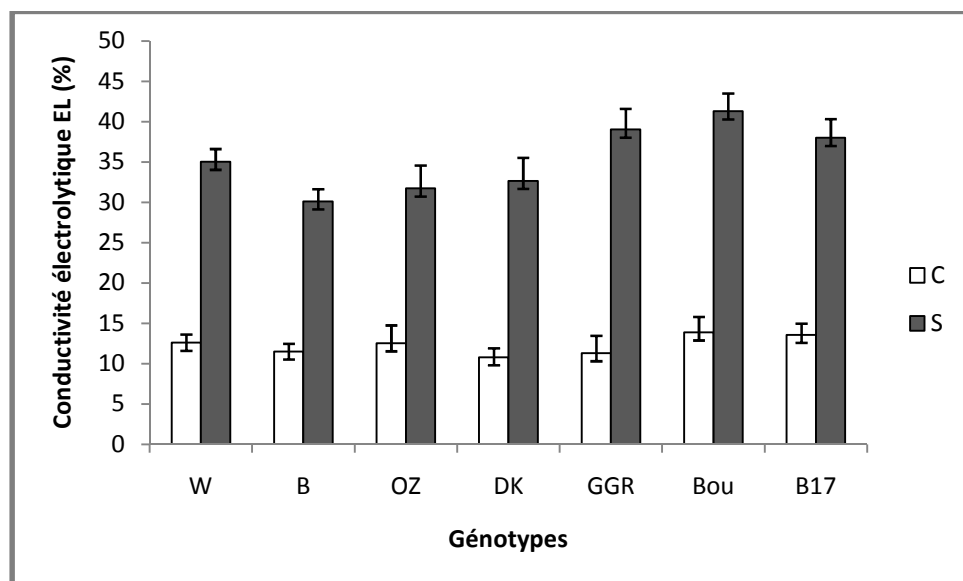
## 2.6. Evolution de la conductivité électrolytique

En conditions contrôles, les variétés étudiées présentent des valeurs de conductivités électrolytiques comprises dans l'intervalle (13,89% - 11,31%). Des valeurs qui restent plus faibles que celles observées en condition déficitaire. Des valeurs appartenant à des intervalles avoisinants ont également été mentionnées dans d'autres investigations et ce en conditions standards. Les variétés (OZ, B) avec des conductivités électrolytiques de (11,31%) et (11,52%) enregistrent les valeurs les plus basses respectivement (Figure.26.).

Au terme de la deuxième semaine de déficit hydrique induit par arrêt d'arrosage, le taux d'électrolytes augmente chez l'ensemble des variétés testées. Cette augmentation est plus



conséquence chez les variétés (Bou, GGR et B17) avec des valeurs maximales de (41,29%, 39,03% et 38%) alors que les variétés B et DK enregistrent des valeurs minimales de (30,13% et 31,73%) (Figure.26.). A mesure que le taux d'électrolytes sera élevé, à mesure que l'intégrité ou la stabilité membranaire sera faible. La conductivité électrolytique est proportionnelle au degré de dommage causé à la membrane cellulaire.



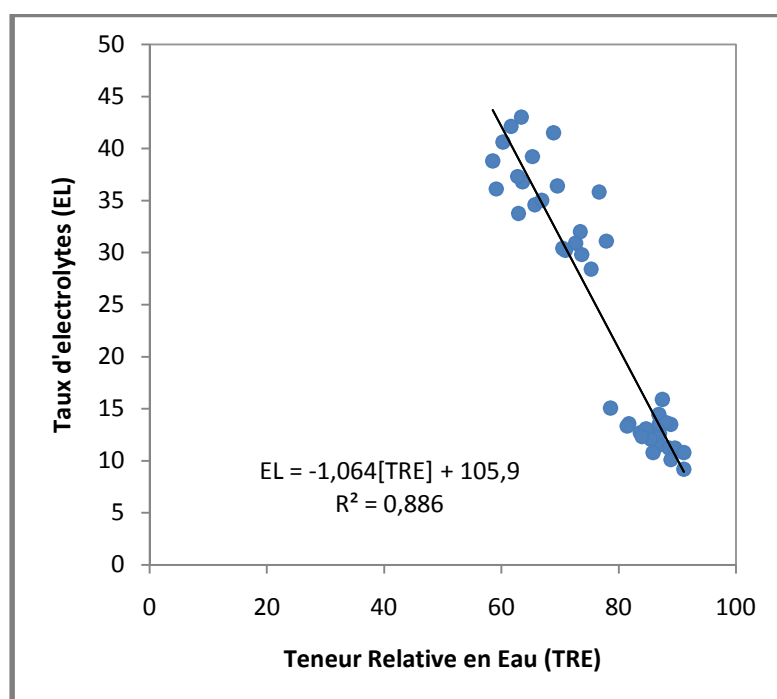
**Figure.26.** Evolution des conductivités électrolytiques (EL) sous condition contrôle (C) et sous conditions de stress hydrique (S) des différentes variétés de blé dur. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$ SD, (n=3).

L'écart constaté entre les conductivités électrolytiques observées pour les deux traitements (irrigués et non irrigués) est significatif (Tableau.16.). L'analyse de variance révèle des différences significatives entre traitements, entre variétés, de même que pour l'effet interaction (Génotype x Traitement). Ainsi le stress hydrique imposé aux plantes, influence leur taux d'électrolytes cellulaires. Une différence significative dans la variation des taux d'électrolytes cellulaires, implique que le niveau de stress hydrique affecte de manière significative la stabilité des membranes cellulaires des plantes. Farissi et collaborateurs (2013) ont également rapporté les effets significatifs du stress hydrique sur l'augmentation du taux d'électrolytes cellulaires.

**Tableau.16.** Carrés moyens de l'analyse de variance de la température foliaire (Tf), de la teneur en chlorophylle (SPAD index), de la teneur relative en eau (TRE) et la conductivité électrolytique (EL) des variétés de blé dur testées.

Facteurs	Paramètres			
	Tf	SPAD	TRE	EL
Géotypes (G)	13,527***	23,694***	46,069***	35,752***
Traitements hydriques (T)	423,669***	352,177***	3754,864***	79784,522***
Interaction (G x T)	8,752***	4,810*	31,630***	18,952**

ns : effet non significatif, \* : effet significatif  $p < 0,05$ , \*\* : effet hautement significatif  $p < 0,01$ , \*\*\* : effet très hautement significatif  $p < 0,001$ .



**Figure.27.** Relation entre le taux d'électrolytes (EL) et la teneur relative en eau (TRE) chez les sept variétés étudiées.

### Discussion

La réponse des plantes au stress hydrique est complexe. Elle reflète l'intégration d'un ensemble de réponse sous-jacente à différents niveaux d'organisation, aboutissant à des

changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires. L'étude de la tolérance au stress hydrique nécessite l'analyse des variations discriminantes pouvant exister entre variétés, lors de la mise en place de leur réponse vis-à-vis de cette contrainte.

Les différentes variétés de blé dur ont été étudiées pour leur tolérance au déficit hydrique, par le biais d'un ensemble de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Un déficit hydrique osmotique par addition de PEG-6000 et un déficit hydrique par arrêt de l'arrosage ont été appliqués.

Les résultats mettent en relief une différence de sensibilité des différents génotypes étudiés, vis-à-vis de la contrainte hydrique. Cette dernière affecte le comportement des génotypes considérés, en ayant entraîné une réduction significative des longueurs foliaires et racinaires, du taux de chlorophylle, de la conductance stomatique, de la matière sèche et de la teneur relative en eau. Mais aussi une augmentation significative de la conductivité électrolytique et de la teneur en sucres solubles. Et ce pour les deux méthodologies d'application du stress. Quant aux températures foliaires observées, l'application du PEG-6000 n'entraîne pas de différence marquée entre variétés ; avec des valeurs qui sont plus basses que celles enregistrées suite à l'arrêt de l'arrosage. Toutefois leur augmentation reste significative sous l'effet du stress osmotique.

De plus, on note que les stratégies adoptées ne peuvent être considérées comme exclusives, dans la mesure où les réponses mises en place sont à même à se combiner. Elles ne rentrent pas de manière exclusive dans une seule catégorie, que se soit dans celle de l'évitement ou dans celle de la tolérance. Quant aux génotypes sensibles, ils ne semblent pas avoir développé de mécanisme efficace d'adaptation à un manque d'eau prolongé.

La fermeture des stomates est un mécanisme d'évitement de la sécheresse, qui constitue l'une des réponses les plus précoces au déficit hydrique par son aptitude à se mettre en place en quelques minutes (Assman et *al.*, 2000 ; Khan et *al.*, 2009). Une fermeture des stomates sera donc suivie par une réduction de la conductance stomatique (Parwata et *al.*, 2012). L'incidence du stress hydrique, sur la réduction de la conductance stomatique constitue une réponse communément observée chez différentes espèces végétales (Djekoun., 1991 ; Nouri., 2002 ; Liang et *al.*, 2002 ; Baloch et *al.*, 2012 ; Parwata et *al.*, 2012) et notamment chez le

blé dur (Sarda et *al.*, 1992 ; Ykhlef et Djekoun., 2000 ; Mouallem., 2010 ; Bousbaa et *al.*, 2013).

Ce qui reste conforme aux résultats trouvés dans notre étude. Nous avons relevé une variabilité génotypique quant à l'aptitude des cultivars à maintenir leurs stomates ouvertes. Fait également rapporté par El jaafari et *al.*, (1993) et Ykhlef (2001). Le maintien d'une ouverture stomatique suffisante (au cours du déficit hydrique) peut être lié à un maintien de la turgescence cellulaire. Cette dernière pouvant résulter d'un meilleur ajustement osmotique (Nouri., 2002) et éventuellement d'une augmentation de la perméabilité membranaire.

Quant aux mécanismes de résistance consistant à diminuer la conductance stomatique, ils ont pour but de préserver le statut hydrique (Parwata et *al.*, 2012). Et ce en diminuant la déperdition en eau par transpiration, avec comme conséquence une diminution de l'assimilation du CO<sub>2</sub>. Cette stratégie peut avoir des répercussions sur la photosynthèse active nette (Cechin et *al.*, 2006). Le maintien d'une activité photosynthétique satisfaisante en conditions stressantes, malgré une diminution de la concentration en CO<sub>2</sub> (suite à la fermeture des stomates), peut-être dû à la mise en place de mécanismes d'adaptation non stomatiques (Ykhlef et Djekoun., 2000 ; Bousbaa., 2013). Un comportement stomatique approprié peut être utilisé à des fins d'amélioration. Des mesures efficaces de cette caractéristique peuvent augmenter la fiabilité d'évaluation de la performance des cultivars en conditions de sécheresse (Khan et *al.*, 2009).

En situation de déficit hydrique, la fermeture des stomates réduit le flux de transpiration (Luquet et *al.*, 2003, Jones., 2004). L'énergie solaire absorbée par les plantes est alors principalement dissipée sous forme d'un flux de chaleur, conduisant à une augmentation de la température foliaire (Kotchi., 2004). Cette réponse physiologique au stress hydrique peut aider les plantes à prévenir le développement d'un déficit hydrique létal. Elle peut toutefois, aboutir à des températures létales en conditions intenses d'ensoleillement et de chaleur (Silva et *al.*, 2007). La capacité de certains génotypes à maintenir des températures foliaires plus basses, résulte de la mise en place de mécanismes leur permettant de maintenir un statut hydrique foliaire plus favorable d'où une meilleure ouverture stomatique. Par conséquent l'influx en CO<sub>2</sub> vers les chloroplastes sera prolongé plus longtemps. Ainsi, cela produira un meilleur taux de photosynthèse (Kumar., 2005 ; Silva et *al.*, 2007). Il faut également mentionner que même lorsque les stomates sont fermés, une faible proportion de transpiration peut avoir lieu, c'est ce que l'on appelle la transpiration résiduelle. Les plantes possédant une

haute densité stomatique présentent de haut niveau de transpiration résiduelle et donc des couverts plus frais (Parwata *et al.*, 2012). Nous avons relevé un effet stress hydrique significatif sur la température foliaire dont les valeurs augmentent en conditions stressantes, fait confirmé par d'autres travaux chez la canne à sucre (Silva *et al.*, 2007), *Jatropha* (Parwata *et al.*, 2012) ainsi que chez le blé (Rizza *et al.*, 2012 ; Aprile *et al.*, 2013). Conformément à Silva *et al.*, (2007), les températures foliaires sont plus élevées d'environ 4°C chez les plantes stressées, comparativement aux contrôles et le taux d'élévation relative étant plus élevé chez les génotypes sensibles. Les températures des génotypes tolérants sont en moyenne inférieures de 2.2°C. De même qu'un effet variété et un effet interaction (variété x stress) significatif a été rapporté par Rizza *et al.*, (2012). Ce qui demeure conforme à nos observations.

Quant aux différences observées entre les deux procédures d'application du stress, elles peuvent s'expliquer d'après les résultats rapportés par Feller., (2006). A savoir que, les températures foliaires des feuilles exposées à un ensoleillement naturel sont supérieures à celles de l'air et les mesures obtenues dépendent d'une série de facteurs tels que : la température de l'air, l'espèce, l'ensoleillement et la convection de l'air.

Les techniques employées, afin de quantifier les pigments chlorophylliens sont basées sur des méthodes exigeant la destruction de l'échantillon. En revanche, l'utilisation du chlorophylle mètre, permet une estimation non destructive du contenu en chlorophylle. Les valeurs obtenues sont fortement corrélées aux valeurs issues des méthodes de dosage (Neufeld *et al.*, 2006 ; Silva *et al.*, 2007). Dans la présente étude, le contenu en chlorophylle des feuilles a diminué suite à l'application du stress hydrique. Des résultats similaires trouvent leur explication dans la littérature, en effet travaillant sur des cultivars de blé, Antolin *et al.*, (1992) ont relevé une diminution du taux de chlorophylle, qui pouvait pour certains génotypes atteindre jusqu'à -50% en conditions de stress sévère. Le déclin dans l'index SPAD est considéré comme un trait aisément mesurable et suffisamment sensible, pour être utilisé à des fins d'évaluation pour la tolérance au stress (O'Neil *et al.*, 2006).

La diminution de la teneur en chlorophylle en conditions de stress hydrique a été signalée chez plusieurs espèces, maïs (Grezesiak *et al.*, 1992), riz (Yang *et al.*, 2001), *Jatropha* (Parwata *et al.*, 2012), canne à sucre (Silva *et al.*, 2007), tournesol (Nouri., 2002), l'orge (Guo *et al.*, 2009) ainsi que chez le blé (Mouallem., 2009 ; Bousbaa *et al.*, 2013). Une diminution qui peut s'expliquer selon Parwata et collaborateurs (2012), par le fait que le déficit hydrique réduit l'assimilation de l'azote via le sol. L'azote étant un composant essentiel dans la formation de la chlorophylle, le stress va donc réduire la concentration des

pigments chlorophylliens. De plus la réduction de la teneur en chlorophylle est considérée comme étant un symptôme typique de stress oxydatif, résultant d'une photo-oxydation des pigments, d'une dégradation et ou d'une synthèse déficiente de chlorophylle (Smirnof., 1995 ; Parwata et *al.*, 2012). Ce qui dépend du type de résistance membranaire de chaque génotype (Grezesiak et *al.*, 1992). Une autre explication tout aussi plausible, est que la diminution du taux de chlorophylle, peut résulter de la réduction de l'ouverture des stomates, ayant comme conséquence une photoinhibition prolongée (Silva et *al.*, 2007 ; Bousbaa et *al.*, 2013). Zaharieva et *al.*, (2001) ont également évoqué une éventuelle incidence des températures foliaires élevées, pouvant induire des pertes en chlorophylle. Un effet que nous n'avons pas noté, dans la mesure où nous avons constaté que des températures plus basses, en conditions de stress osmotique, ne signifiaient pas forcément, des taux de chlorophylle plus bas.

Il a été démontré que les mesures de conductivité électrolytique pouvaient être corrélées avec divers paramètres physiologiques et biochimiques de la réponse des plantes au stress tels que : la synthèse d'enzymes antioxydantes, la résistance stomatique, le potentiel osmotique ou encore l'index d'enroulement foliaire. Ce qui fait de ce paramètre, un important critère pour l'identification de cultivars résistants chez diverses espèces cultivables (Bajii et *al.*, 2001).

Les membranes cellulaires peuvent constituer l'une des premières cibles affectées par le stress chez les plantes ; d'où la grande importance de la notion de stabilité membranaire (Rana et *al.*, 2013). Le degré de dommage membranaire peut être estimé indirectement en mesurant le taux d'électrolytes cellulaires solubles, celui-ci se trouve être inversement proportionnel à la stabilité membranaire (CMS, Cell Membrane Stability) (Farooq et Azam., 2001). Conformément à nos résultats, les effets significatifs de la sécheresse sur la conductivité électrolytique ont été rapportés par plusieurs auteurs (Simova-Stiolovala et *al.*, 2009 ; Abdellaoui et *al.*, 2010 ; Farissi et *al.*, 2013). Simova-Stiolovala et *al.*, (2009) ont noté que les valeurs les plus basses sont relevées chez les témoins (au alentours de 20%), en conditions stressantes le taux d'électrolytes monte et atteint les 50%. Des effets similaires concernant l'augmentation des électrolytes en conditions déficitaires ont été rapportés chez medicago (Farissi et *al.*, 2013), le riz (Agarie et *al.*, 1995), l'orge (Kocheva et *al.*, 2003) ainsi que chez le blé et l'*Aegilops* (Farooq et Azam., 2001). Les taux faibles de conductivité électrolytique enregistrés chez les plantes contrôles suggèrent une meilleure capacité, à maintenir un haut degré d'intégrité membranaire, en comparaison aux plantes stressées (Farissi et *al.*, 2013). La fuite d'électrolytes observés en conditions de stress hydrique est principalement due, à des

dommages affectant les membranes cellulaires qui deviennent alors plus perméables (Almeselmani et *al.*, 2011). Ces dommages peuvent profondément altérer la structure ainsi que la fonction des membranes (Sayar et al., 2008 ; Rana et al., 2013). Et le pourcentage de conductivité électrolytique étant relatif à l'étendue des dommages inférés aux membranes cellulaires (Rana et *al.*, 2013).

Chez les variétés étudiées en condition stressante, la production en matière sèche diminue dans une plus grande mesure au niveau des parties aériennes par opposition aux parties racinaires. Le déficit hydrique semble induire une allocation préférentielle de biomasse vers les racines (Oukaroum., 2007). Le maintien d'un système racinaire important sous stress hydrique permet une meilleure assimilation et une meilleure utilisation de l'eau. Plusieurs auteurs considèrent que le développement de la partie racinaire aux dépend de la partie aérienne est un critère de résistance à la sécheresse (Saab et *al.*, 1990 ; Oukaroum., 2007). Dib et Monneveux (1992) ainsi que Matsuura et *al.*, (1996) suggèrent qu'un système racinaire long et extensif peut conférer un avantage en augmentant l'apport en eau de la partie aérienne. Selon Oukaroum (2007), les variétés d'orge locales se distinguent par leur plus faible pourcentage de réduction du poids sec de la partie racinaire. Les variétés présentant les pourcentages de réduction les plus faibles, semblent être dotées d'une certaine souplesse d'adaptation du système racinaire.

La teneur relative en eau constitue un indicateur clé du degré d'hydratation des cellules et des tissus, ce qui est cruciale pour un bon fonctionnement physiologique et une croissance optimum (Silva et *al.*, 2007). Cette mesure du statut hydrique de la plante reflète son activité métabolique tissulaire (Flower et Ludlow., 1986; Suprunova et *al.*, 2004). La teneur en eau est considérée comme l'un des indexes de tolérance à la déshydratation le plus utilisé et le plus significatif (Anjum et *al.*, 2011 ; Melloul et *al.*, 2014). Dans la présente étude, l'application d'un stress hydrique d'intensité modéré ou sévère, induit chez les variétés une réduction de la teneur relative en eau foliaire d'autant plus élevée que l'intensité du stress est forte et prolongée. L'effet variétal observé entre les différentes variétés, peut-être attribué à des différences dans le pouvoir d'assimilation de l'eau par le système racinaire, à leur pouvoir de contrôle des pertes d'eau par les surfaces évaporatrices (Bayoumi et *al.*, 2008), ou encore à une meilleure perméabilité membranaire à l'eau (Jones et *al.*, 2006). Il peut aussi être attribué à des différences entre les variétés, dans le pouvoir d'ajustement osmotique servant au

maintien de leur turgescence cellulaire et de leurs activités physiologiques (Bayoumi et *al.*, 2008). Cette osmorégulation active peut être liée à l'accumulation des métabolites tels que les sucres (Sassi et *al.*, 2012) et les déhydrines (Dubos., 2001). Certains auteurs suggèrent, que les génotypes qui parviennent à maintenir une TRE élevée sous condition de stress hydrique sont des génotypes tolérants à la sécheresse (Suprunova et *al.*, 2004; Bayoumi et *al.*, 2008, Keyvan et *al.*, 2010 ; Sassi et *al.*, 2012 ; Kara et Brinis., 2011).

L'accumulation des sucres solubles est un moyen adopté par les plantes en cas de stress, afin de résister aux contraintes du milieu (Loreti et *al.*, 2001). L'augmentation de cet osmoticum chez les variétés étudiées, à des taux très variés, corrobore les résultats de (Kerepesi & Galiba., 1998; Mohammadkhani & Heidari., 2009.) qui notent une accumulation variable de cet osmoticum en présence de PEG. Les sucres peuvent exercer une action synergique avec les protéines déhydrines, leur accumulation conjointe pourrait jouer un rôle dans la stabilité membranaire et dans l'ajustement osmotique. En effet, ces osmolytes protègent les membranes contre les effets néfastes de la déshydratation, ils participent en grande partie à l'abaissement du potentiel osmotique chez le blé. L'augmentation est plus marquée chez les génotypes les plus tolérants à la déshydratation (Bammoune., 1997). Selon Hare et *al.*, (1998), l'enrichissement en sucres solubles à une grande incidence sur le maintien d'une pression de turgescence, qui est à la base des différents processus contrôlant la vie d'une plante (photosynthèse, translocation et respiration). De même Geigenburger et collaborateurs (1997) ont attribué l'augmentation des sucres, à une dégradation des réserves amylacées suite à leur conversion rapide en glucose. Cet osmolyte peut être considéré comme un indicateur biologique de tolérance au stress hydrique.

Le stress hydrique affecte les plantes au niveau protéique de différentes façons. Certains auteurs rapportent une augmentation des niveaux protéiques ou encore l'absence d'effet délétère, alors que d'autres sont pour une diminution de ces derniers (Bakalova et *al.*, 2008). Toutefois, des évidences croissantes sont en faveur d'une alternation entre la synthèse d'un ensemble de protéines et la dégradation d'un autre ensemble (Ingram et Bartels., 1996 ; Chaves et *al.*, 2003).

En conditions de stress hydrique, les protéines solubles de haut poids moléculaire (supérieure à 100KDa) tendent à diminuer au niveau des feuilles de blé, alors que celles de faible poids



moléculaire augmentent (Farshadfar et *al.*, 2008). Ceci appuie, le fait que les protéines détectées dans notre étude ont des poids moléculaires qui varient entre 14KDa et 107KDa.

Les différences observées en terme d'intensité de bandes protéiques révélées, ont également été rapportées par Arumingtyas et *al.*, (2013). Ces auteurs ont noté que l'intensité des bandes protéiques était proportionnelle à l'abondance des protéines correspondantes. Conformément à De Rodriguez et *al.*, (2002), l'intensité des bandes est directement liée à la concentration en protéines chez des génotypes de blé. Parmi les protéines détectées, quelques unes sont couramment décelées, alors que d'autres varient entre génotypes en conditions stressantes. De ce fait le stress hydrique entraîne une augmentation de certaines protéines et une diminution d'autres, ce qui constitue une caractéristique variable entre génotypes.

En terme de poids moléculaire des bandes protéiques détectées, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par divers études. Jiang et Hang., 2002 ont rapporté l'accumulation de protéines foliaires de 20, 22, 27, 30, 54, et 59KDa (PM), en conditions de stress hydrique. Mohammadkhani et Heidari., (2008) ont observé l'accumulation de protéines foliaires de 15, 17, 20, 27, 30, 33, 37, 54, 59 et 115KDa (PM). Pour Arora et collaborateurs., (1998), les poids moléculaires des polypeptides accumulés varient entre 26 et 70KDa. Quant à Vaseva et *al.*, (2013) les bandes visualisées possédant un poids moléculaire qui varie entre 18KDa et 60KDa.

Des études antérieures ont conclu que les protéines de 14, 22, 24, 25, 32, 40, 45, 58, 60KDa étaient immunologiquement reliées à la famille des déhydrines s'accumulant en conditions de stress hydrique (Arora et *al.*, 1998; Volaire., 2003; Lopez., 2003; Concha et *al.*, 2004; Vaseva et *al.*, 2010; Arumingtyas et *al.*, 2013).

L'expression des déhydrines a été mise en évidence chez des *Tritiaceae* par Close et *al.*, (2000). Ces auteurs soulignent le fait que certains gènes codant principalement des DHNs de faible poids moléculaire et des DHN alcalines sont uniquement induites par la sécheresse. L'accumulation des déhydrines confère aux cellules une protection contre les effets de la déshydratation (Celier et *al.*, 1998 ; Vaseva et *al.*, 2006). Il a été suggéré que certaines protéines DHNs agissent en temps que molécules signales, en interagissant avec des composants cellulaires distincts à travers leur fonction chaperonne (Brini et *al.*, 2010). Les mécanismes d'induction des DHNs (protéines thermostables) peuvent être consécutifs à des changements dans le potentiel hydrique (Volaire., 2003). Conformément à nos résultats, Rampino et *al.*, (2006) ont noté que ces protéines sont rapidement détectées chez les

génotypes se montrant plus tolérant, alors qu'elles apparaissent plus tardivement chez les génotypes moins tolérants.

Selon Plomion et *al.*, (1999), le stress hydrique cause de profondes altérations du métabolisme cellulaire. Ces changements affectent la tolérance à la sécheresse et peuvent inclure l'induction de protéines déhydrines (protéines thermostables) (Rorat et *al.*, 2006 ; Iskandar et *al.*, 2011). Bien que les principaux gènes codant les protéines impliquées dans la tolérance aux stress abiotiques seraient présents chez toutes les plantes, leur aptitude à induire la tolérance, est quant à elle déterminée par l'efficacité de réponse de la machinerie biochimique (Volaire., 2003).

### Conclusion

Plusieurs paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques tels que: la capacité de germination, les longueurs foliaires et racinaires, le rapport LR/RF, le nombre de racines, la température foliaire, la conductance stomatique, le taux de chlorophylle, la matière sèche, la teneur relative en eau, le taux d'électrolytes, la teneur en sucres solubles, ainsi qu'une électrophorèse 1D SDS-PAGE des protéines thermostables foliaires ont été utilisés, afin d'élucider l'effet d'un stress hydrique et caractériser la réponse de variétés de blé dur Algériennes. Trois expérimentations ont été réalisées sur les différents génotypes étudiés. Deux d'entre elles en conditions contrôlées en chambre de culture et une en conditions semi-contrôlées sous serre. En conditions contrôlées, le stress hydrique a été imposé par addition de polyéthylène glycol-6000 et sous serre par arrêt d'irrigation.

Les études conduites ont fait ressortir des différences significatives entre variétés et entre traitements hydriques pour la plupart des caractères étudiés, exception faite pour : les longueurs foliaires et racinaires, température foliaire (en présence de polyéthylène glycol). Le stress hydrique a induit une diminution de la capacité de germination, du nombre des racines, de la quantité des feuilles en chlorophylle et de la conductance stomatique ayant pour conséquence une diminution de la production en matière sèche. Mais aussi, une diminution de la teneur relative en eau, accompagnée d'une augmentation du taux d'électrolytes et des sucres solubles. Les différences observées concernant les bandes protéiques révélées par 1D SDS-PAGE se traduisent en terme de poids moléculaire et d'intensité.

## *Chapitre 4 |*

*Analyse de l'expression de deux gènes de réponse au stress chez deux variétés de blé dur (*Triticum durum*, Desf.)*

## Analyse de l'expression du gène TdPIP 2 ; 1 et du gène DHN-5 chez deux variété de blé dur

### Introduction

Les mécanismes de tolérance au déficit hydrique sont très complexes et impliquent toute une gamme de gènes, dont l'expression coordonnée permet une réponse efficace. L'expansion des techniques de biologie moléculaire, en particulier celle de la réaction de polymérisation en chaîne, a permis aux chercheurs de caractériser la réponse des plantes à divers stress, en analysant les changements se produisant au niveau des transcrits (Atkinson., 2011).

Dans la plante, l'eau prélevée dans le sol via les racines, passe par le cortex dans les tissus vasculaires où elle peut suivre deux grandes voies possibles ; la voie symplastique qui passe au travers des cytoplasmes et la voie apoplastique qui passe à travers les parois cellulaires. À ce niveau, c'est la grande famille des aquaporines qui assure le passage de l'eau (entrée et sortie) au travers des membranes. Elle permet également une régulation du transfert de l'eau, entre les différents types de cellules et d'organes ; afin d'optimiser son utilisation et rétablir les perturbation osmotique du cytosol lors d'un changement soudain de l'osmolarité (Karlson et *al.*, 2000 ; Maurel et *al.*, 2008). Rien qu'à ce niveau la complexité est énorme, puisque ces tétramères peuvent être répartis en sous-famille, elles même subdivisée en de multiples sous-groupes, ce qui en fait une famille multigénique et qui compte plusieurs isoformes. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existerait au moins 30 AQPs. Certaines, telle que la RD 28 (Yamagushi-Shinozaki et *al.*, 1992), sont induites par le déficit hydrique, d'autres sont réprimées (toujours en condition de stress hydrique), alors que pour d'autres l'expression demeure inchangée.

La synthèse des déhydrines qui représente un lien entre l'environnement et l'activité du noyau, par le biais des gènes qui les encodent, est une réaction commune à la sécheresse chez les végétaux (Qian et *al.*, 2008). Cette famille de protéines de stress, immunologiquement distincte tend à être multigénique et apparaît sur plus d'un chromosome (Campbell et Close., 1997). Chaque espèce végétale possède différents gènes DHNs, dont le nombre varie à son tour entre espèces. Certaines de ces déhydrines, sont surexprimées en réponse au stress abiotique et leur intensité d'expression varie en fonction du type de la protéine, du type de stress et du degré de tolérance du cultivar étudié (Idilko., 2013).

## Chapitre 4 | Analyse de l'expression de deux gènes de réponse au stress hydrique chez deux variétés de blé dur

La résistance au stress hydrique n'est clairement pas monogénique, mais implique l'intervention de multiples gènes assurant une réponse graduelle et coordonnée. La mise en évidence d'une relation entre les gènes de réponse au stress simultanément exprimés, fournit des données d'une grande importance.

## **Résultats**

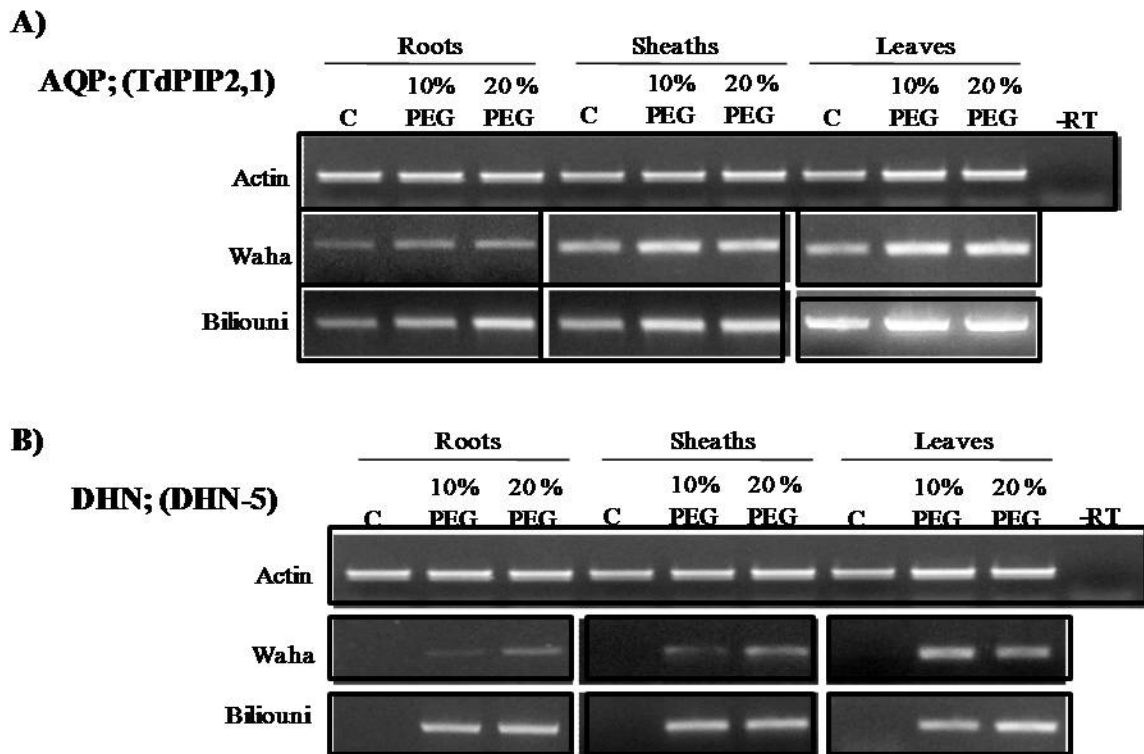
### **1. Effet du stress hydrique sur l'expression du gène TdPIP2 ; 1**

Dans notre étude, nous avons fait appel à la transcriptase reverse PCR, afin d'analyser l'accumulation de l'aquaporine TdPIP2 ; 1 et de la déhydrine DHN-5, en condition de stress hydrique. Le gène d'actine a été utilisé comme contrôle interne (Gene Bank ID : AB181991). Quant aux amorces, elles ont été spécifiquement désignées dans la région 3'UTR de l'AQP TdPIP2 ; 1 afin de pallier à d'éventuelles hybridations croisées.

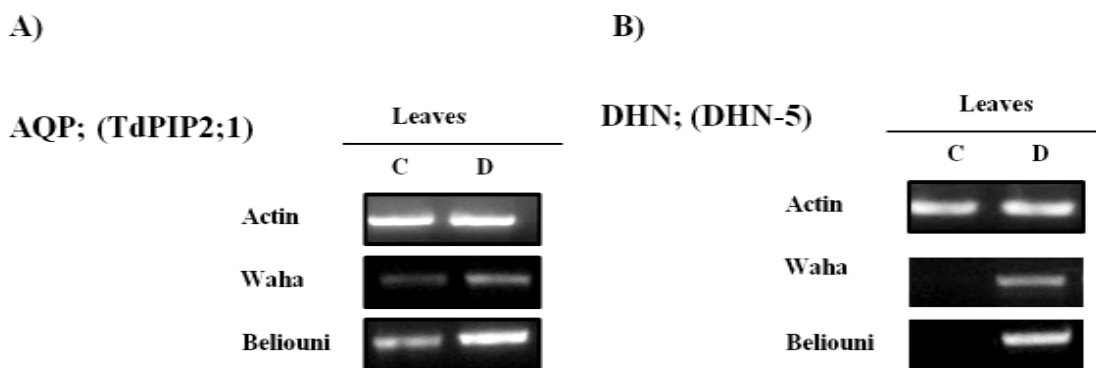
L'expression du gène TdPIP2 ; 1 a été détectée aussi bien au niveau des feuilles qu'au niveau des gaines et des racines, en conditions standards ainsi qu'en conditions de stress hydrique (pour les deux procédures expérimentales employées). Toutefois, l'abondance des mRNA TdPIP2;1 se révèle être plus importante, en condition de stress et ce qu'il soit imposé par arrêt d'arrosage ou par addition de PEG. En effet, le stress hydrique a induit une régulation positive de ce gène. De même que, les transcrits TdPIP2 ; 1 s'accumulent de manière plus abondante chez la variété Belioni comparativement à Waha. Une expression qui s'avère être plus marquée au niveau des feuilles qu'au niveau des racines et à mesure que le stress hydrique s'intensifie. Quant aux gaines, l'expression est quasiment identique chez les deux variétés, elle augmente toujours chez les stressés comparativement aux contrôles, sans qu'il n'y ait de différences notables entre les deux niveaux de stress. Chez les plantes, les gènes AQPs présentent un profil d'expression tissu/organe spécifique. Un profil n'étant pas systématiquement identique même lorsqu'il s'agit de la même isoforme (Tyerman et *al.*, 2002).

### **2. Effet du stress hydrique sur l'expression du gène DHN-5**

De même que pour le gène TdPIP2 ; 1, l'approche RT-PCR a été utilisée afin d'analyser l'expression du gène déhydrine DHN-5. Le gène actine fut également utilisé comme contrôle interne et les amorces désignées dans la région 3'UTR. L'expression de la DHN-5 fut détectée aussi bien dans les feuilles, les gaines que dans les racines en conditions de stress hydrique. En conditions non limitantes aucun transcrit DHN-5 n'a été détecté. Là encore, les mRNA de la DHN-5 ont été positivement régulés par le stress. L'abondance des transcrits fut plus élevée, en considérant les différents organes au niveau des feuilles et en considérant les variétés, chez Belioni.



**Figure.28.** Analyse RT-PCR de **A)** le gène aquaporine (TdPIP2,1) et **B)** le gène déhydrine (DHN5) à partir de différents tissus végétaux de deux variétés de blé dur (B : Belouini et W : Waha) sous conditions contrôles (C) et en présence de PEG (10%, 20%). La taille du cDNA DHN5 attendue est de 344pb, celle du cDNA TdPIP2,1 est de 400pb. La taille du contrôle interne, gène Actine, amplifiée par RT-PCR est de 380pb.



**Figure.29.** Analyse RT-PCR de **A)** le gène aquaporine (TdPIP2,1) et **B)** le gène déhydrine (DHN5) à partir de différents tissus végétaux de deux variétés de blé dur (B :Belouini et W : Waha) en condition contrôle (C) et en condition de stress hydrique (D). La taille du cDNA DHN5 attendue est de 344pb, celle du cDNA TdPIP2,1 est de 400pb. La taille du contrôle interne, gène Actine, amplifiée par RT-PCR est de 380pb.



### Discussion

Les aquaporines fournissent un point d'entrée moléculaire, afin d'étudier les relations hydriques au niveau des plantes et établir des connexions entre le transport de l'eau, le développement ainsi que les réponses adaptatives des plantes à leur environnement changeant (Maurel et Chrispeels., 2001). Des études antérieures ont préalablement démontré l'importance des gènes AQP dans différents aspects de la réponse adaptative des plantes, à la sécheresse (Forest et Bhav., 2010). Les expérimentations portant sur l'établissement de profil d'expression des AQPs, en conditions de stress hydrique, ont produit des résultats extrêmement complexes (Santos et al., 2013). Ainsi, leur rôle exact dans le transport de l'eau en réponse au stress, demeure encore inconnu (Almeida Rodriguez et al., 2010). Des études *in silico* du génome de blé ont permis l'identification de 24 gènes PIPs et 11 gènes TIPs (Forest et Bhav., 2008). La famille des PIPs pouvant être à son tour divisée en deux sous-groupes : PIP1 et PIP2 (Baiges et al., 2002; Aroca et al., 2006; Zhang et al., 2007). Ainsi, un gène PIP1 et un gène PIP2 ont été identifiés chez le blé (Ayadi et al., 2011). Dans la présente étude, les transcrits TdPIP2 ; 1 ont été détectés au niveau des feuilles, ce qui se trouve être consistant avec d'autres études, rapportant l'expression d'AQP PIP2 au niveau des feuilles, comme c'est le cas pour : Richter-110, un hybride de vigne fortement tolérant à la sécheresse (Galmes et al., 2007), l'haricot (Aroca et al., 2006), le riz (Sakurai et al., 2008) et le blé (Ayadi et al., 2011). De même que cette expression a également été détectée dans les racines, un fait consistant avec les observations faites par Yamada et al., (1997) et Aroca et al., (2006). En condition de stress hydrique, des évidences conséquentes de l'implication des aquaporines ont été révélées, aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau post transcriptionnel (Zhang et al., 2007). Le rôle des AQPs, dans la régulation du statut hydrique des plantes, en conditions de stress hydrique est complexe. L'expression des gènes AQPs pouvant subir : une augmentation, une diminution, voire demeurer inchangée (Maurel., 1997; Kawasaki et al., 2001; Galmes et al., 2007). Le profil d'expression de l'AQP TdPIP2 ;1 montre une augmentation de l'expression de ce gène en conditions de stress hydrique, en notant une plus grande accumulation chez la variété Beliouni.

Conformément à Yamada et al., (1997) ainsi qu'à Galmes et al., (2007) l'expression des gènes AQPs, en conditions de stress hydrique, peut être biphasique et peut suivre une double régulation : au préalable, une très faible réduction de la disponibilité en eau résulte en une régulation négative, alors qu'une diminution plus drastique résulte en une régulation positive.

Une régulation négative des gènes AQPs est très fréquemment observée, chez *Arabidopsis thaliana*, pour divers PIPs, avec comme exception les gènes : AtPIP1 ; 4 et AtPIP2 ; 5, dont l'expression augmente (Alexenderson et al., 2005). Selon leur étude faite via des micro-puces à ADN, Kawasaki et al., (2001) suggèrent que la phase initiale de régulation négative est suivie d' une phase ultérieure de régulation positive, chez certaines variétés tolérantes.

Plusieurs gènes MIPs tels que : (*Trg31*) du pois (Guerrero et al., 1990), (*RD28*) d'arabidopsis (Yamaguchi-shinozaki et al., 1992), (*Ptom75*) de la tomate (Fray et al., 1993), (*NeMip1*, *NeMip2*, *NeMip3*) du tabac (Yamada et al., 1997). Ainsi que divers gènes PIP2 : (*RsPIP2*) du radie (Suga et al., 2002), (*RWC3*) du riz (Lian et al., 2004), (*JcPIP2*) de l'arbuste *Jatropha curcas* (Zhang et al., 2007), (*PvPIP2,1*) de l'haricot (Aroca et al., 2006), (*PIP2,1*) de la vigne (Galmes et al., 2007) , (*OePIP2,1*) de l'olive nain (Lovisolo et al., 2007), (*PIP2,1*) d'un hybride de peuplier *P. simonii* x *blasmefera* ( Almeida Rodriguez et al., 2010), (*PIP2,1*) du Caféier (Santos et al., 2013) ; ont été rapportés comme étant positivement régulés en conditions de stress hydrique. Une réponse qui se trouve être commune à différents gènes PIPs , chez les glycophytes (Yamada et al., 1997) et chez la plante de résurrection (Bartel et al., 2006). Une augmentation de l'expression des gènes AQPs est supposée augmenter la perméabilité membranaire au transport de l'eau, en conditions de faible disponibilité (Yamada et al., 1997), afin de faciliter le flux en eau (Smith et Bhave., 2008). Lian et al., (2004) suggèrent que les AQPs des membranes plasmiques peuvent approvisionner (au moins partiellement) les cellules en eau assimilée, afin de maintenir leur turgescence lorsqu'elles sont sujettes à un stress hydrique. Globalement, ces gènes sont supposés être impliqués dans le contrôle du statut hydrique des plantes et dans leur capacité de reprise après irrigation (Santos et al., 2013).

Quant aux études faites en faisant appel à la transgénèse, elles indiquent, elles aussi que les multiples gènes AQPs peuvent être différemment exprimés et ainsi, entraîner des réponses différentes aux changements environnementaux. Des plantules de riz sensibles à la sécheresse surexprimant le gène *RWC3*, montreraient un meilleur statut hydrique en conditions déficitaires. Il a été présumé, que cette AQP est impliquée dans l'ajustement du mouvement de l'eau, à travers la membrane comme mécanisme d'évitement (Lian et al., 2004). La surexpression du gène fonctionnel *TdPIP2 ; 1* dans les plantes de tabac transgénique entraîne une amélioration de la croissance, de la vigueur ainsi qu'une meilleure tolérance aux stress

salin et osmotique (Ayadi et *al.*, 2011). En contrepartie, la surexpression du gène AtPIP1b toujours chez des plantes de tabac transgénique n'apporte aucun effet bénéfique, en condition de stress salin et s'avère même négative en conditions de stress hydrique (Aharon et *al.*, 2003). Globalement, les études portant sur la manipulation des gènes codant pour les PIPs par surexpression ou par suppression, indiquent que ces manipulations provoquent des changements dans la conductivité hydraulique des feuilles et peuvent affecter directement la capacité des plantes à se rétablir après un stress (Verra-Estrella et *al.*, 2004). Toutefois, malgré cette grande variation notée dans la réponse des aquaporines, au stress hydrique et aux stress abiotiques, de manière plus générale : diverses évidences indiquent clairement que ces protéines pourraient être vitales lors de l'assimilation et du transport de l'eau, pour le maintien de l'homéostasie ainsi que l'identification et la création de n'importe quel génotype cultivable tolérant au stress (Forest et Bhave., 2008).

Récemment, les protéines associées au stress hydrique : aquaporines, déhydrines, protéine leafy cotyledon 1-like ainsi que la fructase 1,6 phosphatase ont fait l'objet d'études chez beaucoup d'espèces végétales et ce, afin d'analyser leur implication dans les mécanismes de résistance à la sécheresse (Galmes et *al.*, 2007). Les cascades de signalisation de la déshydratation incluent comme dernière étape, l'altération de l'expression des gènes responsables de la synthèse de composés servant à protéger les structures cellulaires, contre les effets délétères de la déshydratation, telles que les protéines codées par les gènes LEA (Bartels et Souer., 2004). Les DHNs, appartenant à ce groupe de protéines ont été associées à la tolérance au stress hydrique, chez différentes espèces végétales y compris chez le blé (Labhilili et *al.*, 1995; Cellier et *al.*, 1998; Supranova et *al.*, 2004; Brini et *al.*, 2007; Medini et *al.*, 2009).

Dans notre étude, l'accumulation des transcrits DHN-5 n'a pas été détectée en conditions standards. Toutefois, l'application d'un stress hydrique, par arrêt d'arrosage ou par addition de PEG a été suivi par l'accumulation des transcrits DHN-5. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs auteurs : Brini et *al.*, (2007), Medini et *al.*, (2009), Iskandar et *al.*, (2011), Hassen et *al.*, (2013), Melloul et *al.*, (2014). En effet, Choi et *al.*, (1999), ont noté une constante notable, à savoir que, les gènes DHNs codant les déhydrines de type YSK<sub>2</sub> étaient positivement régulés par la déshydratation et par l'ABA. Ceci corrobore nos observations dans la mesure où, la DHN-5 est une protéine de type YSK<sub>2</sub>. En règle

générale, on considère que les plantes sujettes à un stress entraînant une déshydratation (telle que la sécheresse) montrent une hausse substantielle du contenu de la plupart des DHNs (Rorat et *al.*, 2006).

Le fait est que ce gène ne fut point exprimé chez les plantes contrôles, mais uniquement chez les stressées, est consistant avec son implication dans les mécanismes de protection activés par les plantes en réponse au stress hydrique (Rampino et *al.*, 2006). Une plus grande expression du gène en question, pourrait mener à une meilleure tolérance à la sécheresse et donc une réponse cellulaire appropriée, afin d'éviter d'éventuels dommages cellulaires (Iskandar et *al.*, 2011). Les mécanismes d'action des déhydrines demeurent encore non élucidés en détail (Brini et *al.*, 2011). En raison, de leur caractère déstructuré, les DHNs partagent diverses particularités, avec les protéines déstructurées dites intrinsèquement désordonnées. Ainsi, elles possèdent la faculté de pouvoir changer de conformation, suivant le changement affectant leur microenvironnement ambiant (Brini et *al.*, 2011). Un changement de conformation implique un changement de fonction. Ce qui leur permet d'exhiber toute une myriade de fonctions (Hanin et *al.*, 2011). Les déhydrines peuvent être détectées au niveau du noyau et même interagir avec l'ADN. Cette localisation suggère une fonction de stabilisation des chromosomes et de protection de la machinerie transcriptionnelle (Carjuzaa et *al.*, 2008). Les DHNs peuvent également être impliquées dans la protection des protéines et de l'intégrité membranaire (Close., 1997; Wise et Tunnacliffe., 2004 ; Melloul et *al.*, 2014). Selon une étude récente, un gène AQP de tomates (orthologue du gène AtPIP1,4 d'arabidopsis) a été ciblé par la protéine ASR1 (appartenant à la superfamille des protéines LEA) et positivement régulé en réponse au stress hydrique. De plus, les niveaux de transcrits de ce gène AQP diminuent considérablement chez les plantes transgéniques n'exprimant pas le gène ASR1, comparativement aux plantes contrôles non transgéniques (Ricardi et *al.*, 2014). En fait, Brini et collaborateurs., (2011) considèrent que grâce au potentiel de ses propriétés chaperonnes, il n'est pas exclu que la DHN-5 soit impliquée dans la régulation de l'expression d'autres gènes de réponse au stress.

### Conclusion

L'expression du gène DHN-5 n'a pas été induite chez les plantes contrôles mais uniquement chez les plantes stressées. Tandis que, l'expression du gène TdPIP2,1 a été observée pour les deux lots de plantes, mais dans une plus grande mesure chez les plantes stressées. De plus les niveaux de transcrits des gènes étudiés ont été plus marqués chez Beliouni. Cela suggère que les variétés étudiées peuvent reprogrammer la régulation de l'expression de ces deux gènes en condition de stress hydrique. Les aquaporines assurent le transport de l'eau à travers les biomembranes. Un rôle qu'elles ne semblent pas exercer uniquement en condition non limitante. Diverses études ont rapporté l'existence d'évidences tangibles concernant une expression différentielle des transcrits PIPs suite à une exposition au stress. Des profils qui restent complexes et qui ne répondent pas à une régulation typique et invariable. D'un autre côté les déhydrines constituent des protéines de stress dont l'accumulation est typiquement associée avec la tolérance à un stress de déshydratation. Elles sont principalement produites en conditions stressantes. Une surexpression de ces gènes semble améliorer la tolérance au déficit hydrique et entraîner des réponses cellulaires appropriées, afin de pallier au dommage causé par le déficit hydrique à travers divers mécanismes. L'identification d'une connexion possible entre des gènes de réponse au stress positivement régulés peut être d'un grand intérêt en procurant des données extrêmement utiles à l'élaboration d'approches biotechnologiques plus spécifiques et plus élaborées.

*/ Valorisation et productions  
scientifiques*



ISSN NO. 2320-5407

Journal homepage: <http://www.journalijar.com>

INTERNATIONAL JOURNAL  
OF ADVANCED RESEARCH

## RESEARCH ARTICLE

### Drought stress response in two Algerian durum wheat genotypes: physiological and molecular analysis of two stress responsive genes

Chourouk Hamla<sup>1\*</sup>, Faical Brini<sup>2</sup>, Malika Ayadi<sup>2</sup>, Khaled Masmoudi<sup>3</sup>, Abdelhamid Djekoun<sup>1</sup>, Nadia Ykhlef<sup>1</sup>

1.Genetics, Biochemistry and Plant Biotechnology Laboratory 'Team II Biotechnology and Plant Amelioration', Faculty of Nature and Life Science, Constantine 1 University, Constantine, Algeria.

2.Plant Protection and Improvement Laboratory, Centre of Biotechnology of Sfax, Tunisia.

3.International Center for Biosaline Agriculture (ICBA), P.O.Box 14660, Dubai-United Arab Emirates.

#### Manuscript Info

##### Manuscript History:

Received: xxxxxxxx

Final Accepted: xxxxxxxxxxxxxxxx

Published Online: xxxxxxxxxxxxxxxx

##### Key words:

aquaporin, dehydrin, drought, durum wheat, Expression level, Physiological traits

##### \*Corresponding Author

Chourouk Hamla

#### Abstract

Drought is a worldwide constrains affecting plant growth and productivity. This problem is becoming a more serious threat to the high-quality crop production within a changing climate. Drought triggers a variety of plant responses by modifying a range of genes expression. The aim of this work was to study two durum wheat genotypes (Waha and Beliouni) response to drought stress at physiological and molecular level, by focusing on two stress responsive genes (Dehydrin and Aquaporin). At the physiological level, the characterization of genotypes response was performed by determination of germination rate (GT), relative water content (RWC), leaf temperature (LT) stomatal conductance ( $g_s$ ), chlorophyll content (SPAD index) and electrolyte leakage (EL). Expression level of an aquaporin gene (TdPIP2,1) and a dehydrin gene (DHN5) was also analyzed in different plant tissues under different drought stress conditions. The DHN5 gene is not expressed in the well watered plants but only in the stressed plants, while the TdPIP2,1 is expressed in both with more higher in stressed tissues. Moreover, the transcript level of the two genes was more accumulated in the tolerant genotype (B) than the more sensitive one (W). These results confirm our physiological data. Identification of a possible connection between activated stress responsive genes can be useful by providing a starting point to further elaborate biotechnology-based approaches.

Copy Right, IJAR, 2014,. All rights reserved

#### Introduction

Wheat production in Mediterranean region is greatly reduced by drought. As the warming of the climate system became unequivocal, drought events are increasing (Cattivelli et al., 2010, Bhargava and Sawant., 2013). Understanding the response of plants to their external environment is of importance for developing drought tolerant agriculture species (Bernachia and Furini., 2004). Because of the complexity of abiotic stress tolerance mechanisms, biotechnology need to be complemented with plant physiology and breeding (Vinocur and Altman., 2005, Gupta et al., 2014). Plant tolerance responses rely on the expression of several genes (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki., 2007). The outcome is a change in transcriptional programs leading to physiological responses. Among these responses, the synthesis of new proteins, including dehydrins and aquaporins (Bhargava and Sawant., 2013). Water movement across membrane is facilitated by aquaporins (AQP), proteins belonging to the conserved family of major intrinsic proteins (MIPs) ((Maurel., 2008, Chaumont and Tyerman., 2014). Fives subfamilies of plants MIPs have been identified, among them the [Plasma membrane Intrinsic Proteins, PIPs]. PIP proteins could also be divided into



two subgroups PIP1 and PIP2 (Almeida-Rodriguez et al., 2010). The AQP appears as tetramers each of the monomers acting as an independent water pore (Tyreman et al., 2002, Maurel., 2007). Over the last decade evidence has accumulated showing that water stress can change the expression patterns of MIPs (Lovisololo et al., 2007). In fact, water transport by AQP does not appear to be only for house-keeping. Various studies revealed a differential expression of mRNA transcripts and/or PIPs proteins upon exposure of plants to stresses such as salt, drought, or cold (Forest and Bhave et al., 2008). The wide variation of plant AQP expression is influenced by the species, developmental stage, growth conditions (Tyreman et al., 2002; Almeida-Rodriguez et al., 2010), and could also be influenced by the intensity and duration of stress (Galmes et al., 2007). Experimentations on the expression patterns of various AQP under water stress have brought extremely complex results (Santos et al., 2013). Thus their role is still not completely understood. However, these proteins would be vital for water flow, homeostasis and identification or creation of any stress tolerant genotypes of crop species (Forest and Bhave et al., 2010).

The dehydrins (DHN) or group 2 LEA proteins are by far the most frequently described under stress conditions (Close.,1996, Goyal et al., 2005, Rorat et al., 2006, Brini ., 2007). These peripheral membrane proteins could be located in cytosol, nucleus and near plasma membrane (Qian et al., 2008, Hassan et al., 2013). They are thought to be involved in water binding molecules and stabilizing both macromolecules and membranes (Melloul et al., 2014). This protective effect may be exerted either by direct interaction or by acting as molecular shield (Allagulova et al., 2003, Wise and Tunnacliffe., 2004). Actually it has been suggested that DHN might exhibit specialized individual functions instead of one general function (Ildeko., 2013). Nevertheless DHN accumulation is associated with drought stress tolerance in different plant species (Rampino et al., 2006, Vaseva et al., 2013). The aim of the work was to study two durum wheat genotypes responses to drought stress at physiological and molecular level by focusing on two stress responsive genes, Dhn gene (Dhn5) and AQP gene (TdPIP 2,1).

## Materials and methods

### Plant material and stress conditions

Two Algerian cultivars of durum wheat (*Triticum durum* Desf L.), Waha (W) and Belioni (B), were supplied by ITGC, Institut Technique des Grandes Cultures (Station El-khroub Algeria) and used in our experimentations. To test the response of seeds to drought stress, 25 seeds of the two wheat cultivars after being sterilized, were studied using distilled water (controls) and polyethylene glycol (PEG 6000) solutions of 10% (-0,6MPa) and 20% (-1,2MPa). As PEG is frequently used to induce water stress in germination experiments (Vahid., 2009; Jurial Balock et al., 2012). After two weeks of incubation (25°C, 16h-light/8-h dark photoperiod and 60± 10% relative humidity), percentage of germination was determined. For other drought test, seeds were surface sterilized and pre-germinated in Petri dishes for 48h at room temperature and then transferred into pots containing a sand/soil mixture and grown under greenhouse conditions (16h photoperiod, 27 ± 10°C, 50 ± 10% relative humidity). Drought stress was imposed at the third leaf stage. The pots of each cultivar were divided into two groups: one was left as control and irrigated with tap water and the other was restricted to drought by withholding water up to the end of the experiment (twelve days). Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### Physiological analysis

Leaf RWC was measured in control and stressed plants. Leaves were excised and weighted immediately (FW). The turgid weight (TW) was measured after floating on deionized water at 4°C for 24h in darkness. Dry weight (DW) was recorded after drying for 48h at 70°C. The RWC was calculated by the formula as given by González and González-Vilar., (2003): (fresh weight- dry weight)/ (rehydrated weight- dry weight) x100. The physiological status of plants was monitored by RWC. The stomatal conductance was measured at mid-morning on the adaxial leaf surface with a hand-held porometer (AP4). The given values represent the stomatal resistance ( $r_s$ ), from which we deduced the stomatal conductance ( $g_s$ ):  $g_s = 1/r_s$ . In order to find out leaf chlorophyll content, SPAD index was estimated nondestructively using a SPAD chlorophyll meter (Minolta crop, USA). It is a hand held spectrometer which measures light (650nm) absorbed by single leaves and gives an estimation of plant chlorophyll. This index was used preferentially as the strong relationship between readings of the chlorophyll meter and leaf chlorophyll content has been demonstrated by previous works (Neufeld et al., 2006, Silva et al., 2007). For leaf temperature, the evaluation was done using a hand held infrared thermometer. The thermometer was held so that the sensor viewed only the leaf surface within its natural orientation to avoid shade effects. Electrolyte leakage was determined according to the method described by Dkhil and Denden., (2012). Leaf samples were washed with distilled water in order to remove surface adhered electrolyte or tissue particles and then cut into discs of uniform size. After which the samples were immersed in 10 ml distilled water at room temperature. 24 h later, the conductivity of the solution



(C<sub>1</sub>) was read. The samples were autoclaved at 120°C for 20 min, cooled to room temperature and conductivity of the solution (C<sub>2</sub>) was read again. Electrolyte leakage was calculated as the ratio of C<sub>1</sub> to C<sub>2</sub>.

### RNA extraction and RT-PCR assay

Total RNA was extracted from 100 mg leaf tissue using the RNeasy total RNA isolation kit (Qiagen). To remove contaminating DNA, RNA<sub>s</sub> (10 mg) were treated with RNase-free DNase (Promega). DNase treated RNA samples (0.5 mg) were reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). The reverse transcription (RT) reactions were performed at 37°C for 1h using 2 mM oligo-dT18. Two microlitres of the first strand cDNA was used as templates for PCR amplification. The TdPIP2,1 gene was amplified using specific primers reported in Table 1. Specific primers designed in the 3'UTR region of TdPIP2,1 were used to avoid any possibility of cross hybridization, nevertheless a possible cross-reaction cannot be excluded (Ayadi et al., 2011). For the DHN5 gene, we also used the 3'UTR end as a probe. The DHN5 gene was amplified using specific primers reported in Table 1 (Brini et al., 2007). A wheat Actin gene fragment used as an internal control was also amplified with the primers reported in Table 1. Samples were denatured for 3min at 94°C and run for 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 50 °C and 2 min at 72°C followed by 5 min at 72°C as a final extension. To separate PCR product, an agarose gel electrophoresis was performed, stained with ethidium bromide and analyzed under ultra violet (UV) light.

### Statistical analysis

For all collected data of the physiological parameters, standard deviation of means was calculated and analysis of variance was carried out, the means were compared using Newman and Keuls test.

## Results

### Physiological analysis

The results revealed that under standard condition, the germination percentage of both cultivars was high (>90%). However, these percentage declined with PEG imposition and with a higher amount under 20% (-1,2MPa). Considering both genotypes, (W) suffered more under the PEG induced drought stress than (B). As expected, leaf RWC differed according to water treatment, the differences were highly significant (P<0.0001). Values ranged from a high of approximately 87 % showed by (B) for well watered condition to a low of approximately 64 % showed by (W) for the none watered. Drought stress can also affect leaf temperature. The values observed under control conditions become significantly (P<) higher under stress conditions, although with a lesser extent in (B). The results for the above parameters are shown in Table 2 and Figure 1.

Under stress conditions, a decrease in stomatal aperture was observed as indicated by lowering of stomatal conductance. The plants with optimum watering had significantly higher stomatal conductance than those under drought conditions (P<0.0001). Considering stressed plants separately, even so, (B) exhibited higher values than (W). As well as for the chlorophyll content, here to, it decreased significantly in all genotypes under drought conditions in comparison with controls (P<0.0001). Among stressed plants, (B) (with 38) had significantly higher SPAD index than (W) (with 35) (P<0.05). Our results also revealed that for both cultivars, electrolyte leakage increased under stress conditions, the lower values were recorded under control condition and significant difference was found between varieties (P<). These results are shown in Table 3 and Figure 2.

### Expression analysis of the candidate genes TdPIP2,1 and DHN5

We have studied the expression level of two candidate genes involved in the plant desiccation. RT-PCR analysis of the AQP gene TdPIP2,1 in cultivars (W) and (B) exposed to 10% and 20 % PEG showed a high expression levels of TdPIP2,1 in the sheaths and in the leaves of the two genotypes compared to the roots in stress conditions. In control plants the mRNA levels of the TdPIP2,1 were maintained at low levels (Figure 3). When we compared the two genotypes, it seems that (B) accumulate more transcript than (W). For DHN-5, the expression levels was comparable to TdPIP2,1 except for the control tissues who we noticed the absence of transcripts in all plant tissues (Figure 3). A slightly higher expression of DHN-5 was observed in (B) as compared to (W) (Figure 3).

**Table 1. Primers used in PCR expression analysis.**

Primer sequence (5' to 3')	Target gene	Gene bank accession number	Amplicon size (bp)
TCCATCCAACACCAACTAATAAC GGCGTACCACAGTACATCC	TdPIP2,1	EU182655.1	400

GCGAATTCGAGGACGACGGCATGGGC GAATTCTCAGTGCTGGCCTGGG	DHN5	AY619566.1	344
GTGCCCATTTACGAAGGATA GAAGACTCCATGCCGATCAT	Actin	AB181991	380

**Table 2. Result of Variance Analysis for germination rate (GT), leaf relative water content (RWC) and leaf temperature (LT) under control and drought conditions.**

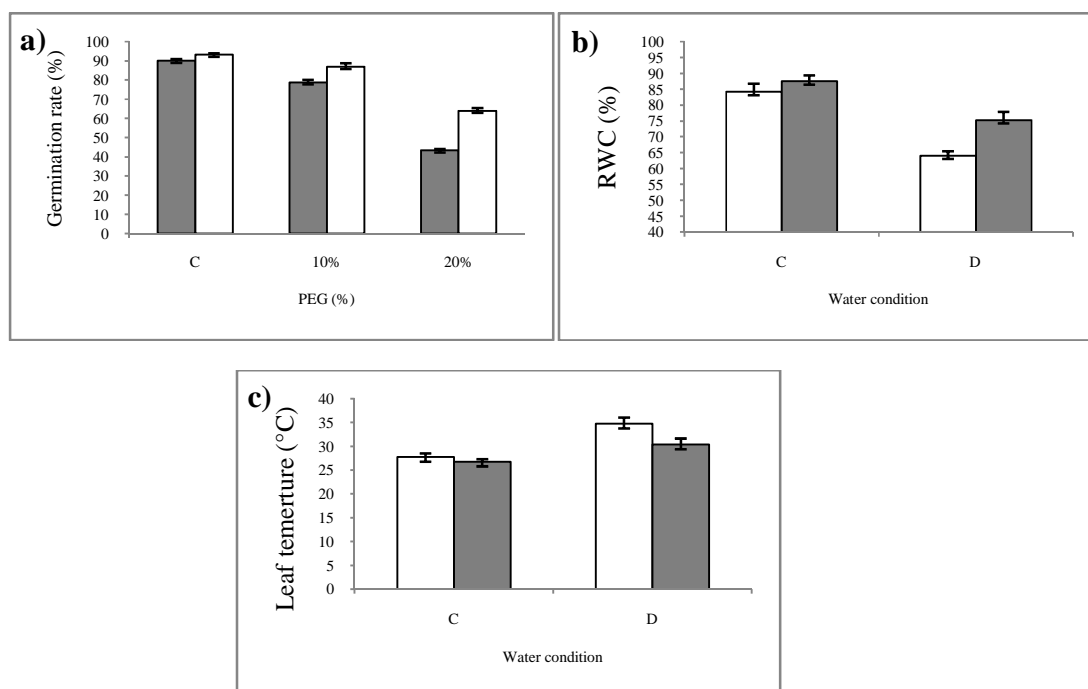
Treatments	Parameters		
	GT	RWC	LT
Water conditions (W)	2384,397***	780,531***	83,741***
Genotype (G)	515,205***	159,287***	21,068**
Interaction (GxW)	118,795***	46,571**	8,501*

Values are mean squares. \*(P<0.05); \*\*(P<0.01); \*\*\*(P<0.0001).

**Table 3. Result of Variance Analysis for stomatal conductance ( $g_s$ ), estimated chlorophyll content (SPAD index) and electrolyte leakage (EL) under control and drought conditions.**

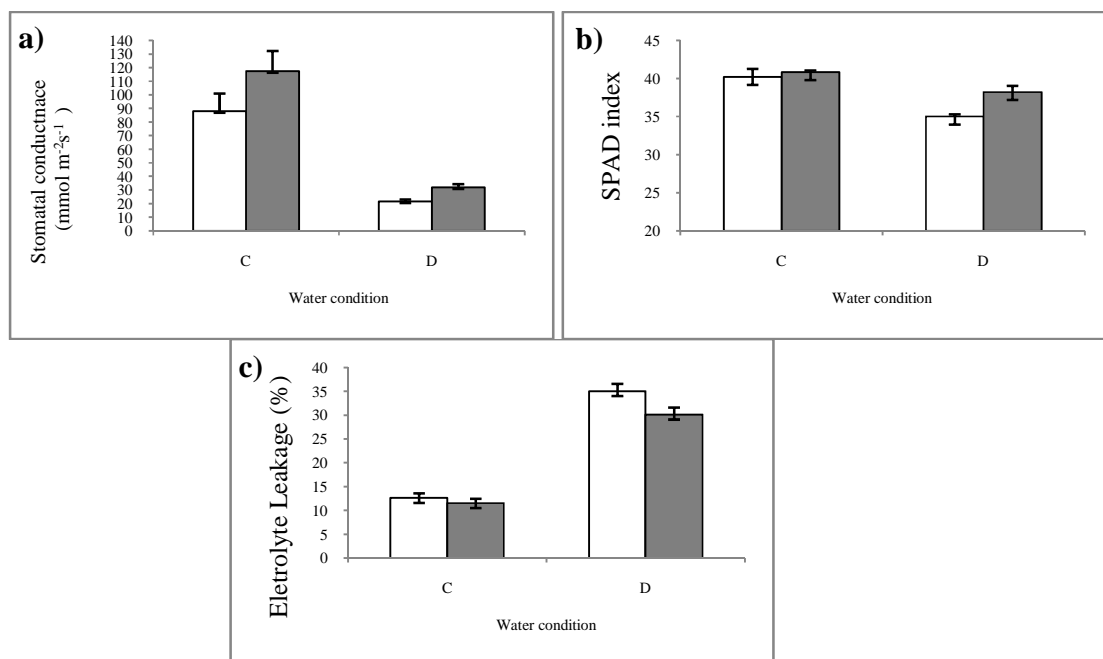
Treatments	Parameters		
	$g_s$	SPAD index	EL
Water conditions (W)	19201,600***	59,703***	1247,256***
Genotype (G)	1728,480**	14,297**	29,324**
Interaction (GxW)	560,060**	6,410*	12,526*

Values are mean square. \*(P<0.05); \*\*(P<0.01); \*\*\*(P<0.0001).

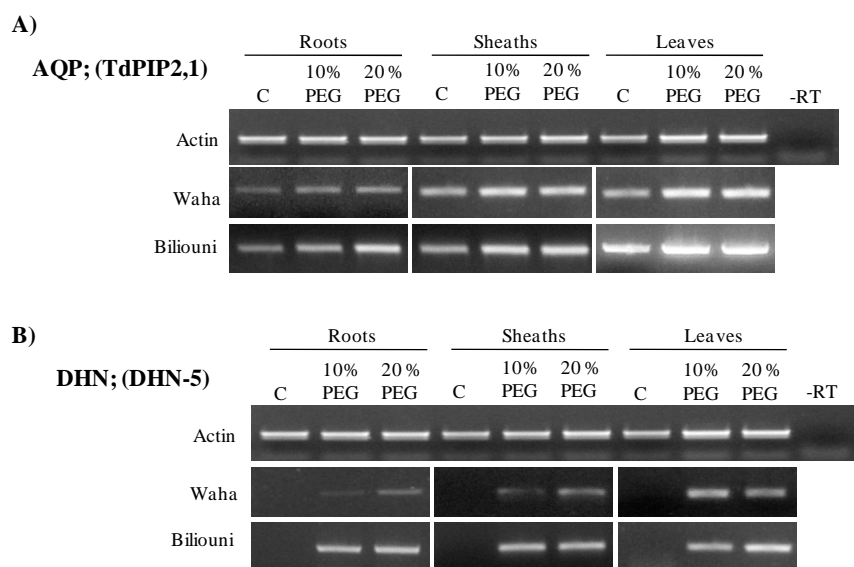


**Figure 1.**

**Figure1. Effects of drought stress on a) Germination rate (GT), b) leaf Relative water content (RWC), c) Leaf temperature (LT) of two durum wheat genotypes (W) (white bars), (B) (grey bars) under control (C) and drought (D) conditions. Values are means  $\pm$  SD (n=3).**



**Figure 2. Effects of drought stress on a) Stomatal conductance ( $g_s$ ), b) estimated chlorophyll content (SPAD index), c) Electrolyte leakage (EL) of two durum wheat genotypes (W) (white bars), (B) (grey bars) under control (C) and drought (D) conditions. Values are means  $\pm$  SD (n=3).**



**Figure 3. RT-PCR analysis of (A) the aquaporin gene (TdPIP 2,1) and (B) the dehydrin gene (DHN5) in plant tissues of the two wheat genotype (B and W) under different stress conditions. The expected size of cDNA DHN5 is 344pb and TdPIP2,1 is 400pb. A 380pb Actin was amplified by RT-PCR as internal control.**

## Discussion

Drought tolerance under germination phase can be considered as an important criterion for plant survival and adaptation (Sassi et al., 2012). In fact, water stress may reduce or even prevent germination completely. Genotypic differences have been observed under PEG induced drought stress in particularly at -1,2MPa, (W) appeared to be more sensitive to water stress at germination phase than (B). Similar results have been reported previously (Khayatnezhad and Golamin., 2011). Under non stressed conditions, the analyzed samples exhibited RWC values compatible with a non stressed status. The values declined after water stress application. RWC is often used to investigate cell and tissue hydration which is highly required for optimum physiological function (Silva et al., 2007). Many studies have shown a reduction in leaves RWC, when subjected to drought (Talamè et al., 2006, Parwata et al., 2012, April et al., 2013, Melloul et al., 2014). Water stress affected stomatal conductance as well. The plants with optimum watering had higher values than those under stress conditions. This decrease had been mentioned by many authors (Ykhlef and Djekoun., 2000, Baloch et al., 2012, Parwata et al., 2012). Plants adopt different strategies to avoid drought. Stomatal closure is one of them (Parwata et al., 2012). At severe stress, in order to optimize plant water status, an increase in AQP expression with low stomatal conductance may boost membrane permeability and thus water transport (Galmes et al., 2007). When plants are subjected to drought stress (transpiration decreases), a lower stomatal conductance result in reduced evaporative cooling and thus in leaf temperature increase (Rizza et al., 2012; April et al., 2013). The genotype showing a relatively lower leaf temperature may be able to preserve a more favorable leaf water status (Silva et al., 2007). In addition to the previous parameters, leaf chlorophyll content was also affected by water deficit. Leaf chlorophyll amount could be a good indicator of plant physiological performance (Neufeld et al., 2006). The reduction of chlorophyll may be a consequence of chlorophyll degradation resulting from a prolonged photo-inhibition (Silva et al., 2007). Previous investigations have reported a reduction in chlorophyll concentration in water stressed durum wheat (Bousba et al., 2013), barley (Guo et al., 2009) and sugarcane (Silva et al., 2007). Studies have shown that, more tolerant wheat varieties tend to keep higher relative water content and higher chlorophyll content. (Atteya., 2003, Parwata et al., 2012). Cell membrane could also be targeted by drought and its stability is of a great importance (Rana et al., 2013). The range of membrane damage was assessed indirectly by measurement of cells solute leakage which is inversely proportional to cell membrane stability (CMS) (Farooq and Azam., 2001). Our results revealed that membrane integrity was more conserved for (B) than (W). Drought induced electrolyte leakage has also been reported by others (Farissi et al., 2013). In fact the rate of injury to plasma membrane can be evaluated through electrolyte leakage from cells (Rana et al., 2013), and the proportion of leakage is relative to cell membrane damages (Sayar et al., 2008). AQP genes are important for many aspects of plant adaptation to drought (Forrest and Bhave., 2010). However, their role in leaf water transport under drought conditions remains unclear (Almeida-Rodriguez et al., 2010). The TdPIP2;1 mRNA was detected in leaves of both (B) and (W), which is consistent with previous reports showing the expression of a PIP2 AQP in leaves (Galmes et al., 2006, Aroca et al., 2006, Ayadi et al., 2011). The pattern followed by the expression profile of the TdPIP2;1 in leaves showed an increase under water stress with higher extent in (B) than (W). During drought stress, evidence for strong regulation of PIPs was found on transcriptional level (Zhang et al., 2007). According to previous studies, the AQP genes expression under water stress is dual and follows two phases: a moderate decrease in water availability results in down-regulation, while the more drastic decrease results in up-regulation (Yamada et al., 1997, Galmes et al., 2004). Our observations are consistent with the second phase. The down regulation of AQP gene expression is most commonly observed in Arabidopsis, with exception for: AtPIP1,4 and AtPIP2,5 (Alexenderson et al., 2005). However, Kawasaki and coworkers (2001) suggested that the initial down-regulation is followed by a subsequent up-regulation of AQP gene expression. Likewise, some MIP (Yamada et al., 1997, Lian et al., 2004) and PIP2 genes (Suga et al., 2002, Aroca et al., 2006, Zhang et al., 2007, Galmes et al., 2007, Lovisollo et al., 2007, Almeida-Rodriguez et al., 2010 and Santos et al., 2013) have been reported to be up-regulated under drought. The up-regulation is thought to increase membrane permeability to water transport when water is less available (Yamada et al., 1997) to facilitate water flux (Smith and Bhave., 2007) and thus to control water status (Santos et al., 2013). Dehydrins accumulation, have been previously associated with drought stress tolerance. Our results showed that DHN-5 transcript was not detected in plant tissues under standard conditions. However, upon water stress treatments there were highly accumulated in both genotypes, which is consistent with the results previously reported by others (Brini et al., 2007; Medini et al., 2009, Iskandar et al., 2011, Melloul et al., 2014). Thus, plants subjected to cellular dehydration show substantial increase in the amount of most DHNs (Rorat et al., 2006). The fact that DHN5 gene was not expressed in well watered plants but only in the stressed ones, is consistent with a protection role adopted by plants in response to drought stress (Rampino et al., 2006). The DHN genes expression in drought stressed tissues may pull along tolerance mechanisms by inducing an appropriate cellular response, in order to prevent dehydration damages (Melloul et al., 2014). The mechanism of action of DHNs is not known in detail (Brini et al., 2011). Due

to their intrinsically unstructured character, DHNs can change their conformation and so they can exhibit versatile functions (Hanin et al., 2011). Thus, they can be implicated in protecting proteins and membrane integrity (Close., 1999; Wise and Tunnacliffe., 2004). DHNs can be transported between the nucleus and the cytoplasm suggesting a role in the transcriptional machinery (Carjuzaa et al., 2008). The upper expression of DHN5 coincide with the upper expression of TdPIP2,1 especially in (B). This is suggesting specific functional role of these proteins especially in drought stress tolerance. According to a recent study, a tomato AQP gene (AtPIP1,4 ortholog) was targeted by an ASR1 protein (LEA superfamily) and so up-regulated during drought stress (Ricardi et al., 2014). Moreover, transcripts levels of this AQP gene were found lower in ASR1 silenced plants (Ricardi et al., 2014). In fact, Brini and coworkers, (2011) consider that through its potential chaperon property it's not excluded that the dehydrin (DHN-5) can be implicated in regulating the expression of other stress responsive genes

## Conclusion

Plants breeding efforts to improve drought tolerance would be aided by a better understanding of the stress response on the cellular and molecular level. Our finding suggests that durum wheat can be able to adjust the expression of DHN5 and TdPIP2,1 according to environmental conditions. The upper expression of these two stress responsive genes may be valuable by setting up stress tolerance mechanisms in the different tissues and especially in leaves. Thus conduct to an appropriate cellular response and prevent dehydration damages. This investigation could be a starting point for more elaborate analysis of the regulation network DHN-stress responsive genes and to establish if the DHN5 has as a target an AQP gene and what are the others. Identification of a possible connection between activated stress responsive genes can be useful by providing a starting point to further elaborate biotechnology-based approaches.

## Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria and Tunisia. Authors are grateful to the ITGC (Institut Technique des Grandes Culture) for providing seeds. Authors thank also Mrs Moualef Adra for her help.

## References

- Allagulova, C. R., Gimalov, F. R., Shakirova, F. M., and Vakhitov, V. A. (2003). The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Moscow)*, 68(9), 945-951.
- Almeida-Rodriguez, A. M., Cooke, J. E., Yeh, F., and Zwiazek, J. J. (2010). Functional characterization of drought-responsive aquaporins in *Populus balsamifera* and *Populus simonii* × *balsamifera* clones with different drought resistance strategies. *Physiologia plantarum*, 140(4), 321-333.
- Aprile, A., Havlickova, L., Panna, R., Marè, C., Borrelli, G. M., Marone, D., Perrota, C., Rampino, P., De Bellis, L., Curn, V., Mastrangelo, A.M., Rizza, F., and Cattivelli, L. (2013). Different stress responsive strategies to drought and heat in two durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency. *BMC genomics*, 14(1), 821.
- Aroca, R., Ferrante, A., Vernieri, P., and Chrispeels, M. J. (2006). Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of botany*, 98(6), 1301-1310.
- Atteya, A. M. (2003). Alteration of water relations and yield of corn genotypes in response to drought stress. *Bulg. J. Plant Physiol*, 29(1-2), 63-76.
- Ayadi, M., Cavez, D., Miled, N., Chaumont, F., and Masmoudi, K. (2011). Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum) and their role in abiotic stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(9), 1029-1039.
- Baloch, M. J., Dunwell, J., Khan, N. U., Khakwani, A. A., Dennett, M., and Jatoi, W. A. (2012). Profiling dehydrin gene sequence and physiological parameters in drought tolerant and susceptible spring wheat cultivars. *Pakistan Journal of Botany*, 44(2), 801-806.
- Bernacchia, G., and Furini, A. (2004). Biochemical and molecular responses to water stress in resurrection plants. *Physiologia plantarum*, 121(2), 175-181.
- Bhargava, S., and Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, 132(1), 21-32.
- Brini, F., Hanin, M., Lumbreras, V., Irar, S., Pages, M., and Masmoudi, K. (2007). Functional characterization of DHN-5, a dehydrin showing a differential phosphorylation pattern in two Tunisian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties with marked differences in salt and drought tolerance. *Plant science*, 172(1), 20-28.

- Brini, F., Yamamoto, A., Jlaiel, L., Takeda, S., Hobo, T., Dinh, H. Q., and Hanin, M. (2011). Pleiotropic effects of the wheat dehydrin DHN-5 on stress responses in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology*, 52(4), 676-688.
- Carjuzaa, P., Castellión, M., Distéfano, A. J., Del Vas, M., and Maldonado, S. (2008). Detection and subcellular localization of dehydrin-like proteins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) embryos. *Protoplasma*, 233(1-2), 149-156.
- Cattivelli, L., Ceccarelli, S., Romagosa, I., and Stanca, M. (2010). Abiotic stresses in barley: problems and solutions. *Barley: improvement, production, and uses*. Wiley, Harrisonburg, 282-306.
- Chaumont, F., and Tyerman, S. D. (2014). Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant physiology*, 164(4), 1600-1618.
- Close, T. J. (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97(4), 795-803.
- Dkhil, B. B., & Denden, M. (2012). Effect of salt stress on growth, anthocyanins, membrane permeability and chlorophyll fluorescence of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedlings. *American Journal of Plant Physiology*, 7(4), 174-183.
- Farissi, M., Bouizgaren, A., Faghire, M., Bargaz, A., and Ghoulam, C. (2013). Agrophysiological and biochemical properties associated with adaptation of *Medicago sativa* populations to water deficit. *Turkish Journal of Botany*, 37(6), 1166-1175.
- Farooq, S. and Azam, F. (2001). Co-Existence of Salt and Drought Tolerance in Triticeae. *Hereditas*, 135(2-3), 205-210.
- Forrest, K. L., and Bhave, M. (2008). The PIP and TIP aquaporins in wheat form a large and diverse family with unique gene structures and functionally important features. *Functional & integrative genomics*, 8(2), 115-133.
- Forrest, K. L., and Bhave, M. (2010). Physical mapping of wheat aquaporin genes. *Theoretical and applied genetics*, 120(4), 863-873.
- Galmés, J., Pou, A., Alsina, M. M., Tomàs, M., Medrano, H., and Flexas, J. (2007). Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta*, 226(3), 671-681.
- González, L., and González-Vilar, M. (2003). Determination of Relative Water Content. In M. Reigosa Roger (Ed.) *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques* (pp. 207-212). Netherlands: Springer
- Guo, P., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., Bai, G., Li, R., and Valkoun, J. (2009). Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of experimental botany*, 60(12), 3531-3544.
- Gupta, N. K., Agarwal, V. P., Gupta, S., Singh, G., and Purohit, A. K. *International Journal of Applied Life Sciences and Engineering (IJALSE)*.
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., and Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant signaling & behavior*, 6(10), 1503.
- Hassan, N. M., El-Bastawisy, Z. M., El-Sayed, A. K., Ebeed, H. T., and Nemat Alla, M. M. (2013). Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. *Journal of Advanced Research*.
- Ildikó, B. (2013). Analysis of Structure and Function of the Intrinsically Disordered Dehydrin ERD14.
- Iskandar, H. M., Casu, R. E., Fletcher, A. T., Schmidt, S., Xu, J., Maclean, D. J., Manners, J.M., and Bonnett, G. D. (2011). Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. *BMC plant biology*, 11(1), 12.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, J.M., and Bohnert, H. J. (2001). Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell Online*, 13(4), 889-905.
- Khayatnezhad, M., and Gholamin, R. (2011). Effects of water and salt stresses on germination and seedling growth in two durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes. *Scientific Research and Essays*, 6(21), 4597-4603.
- Lian, H. L., Yu, X., Ye, Q., Ding, X. S., Kitagawa, Y., Kwak, S. S., Su, W.A., and Tang, Z. C. (2004). The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant and Cell Physiology*, 45(4), 481-489.
- Expression of PIP1 and PIP2 aquaporins is enhanced in olive dwarf genotypes and is related to root and leaf hydraulic conductance. *Physiologia Plantarum*, 130(4), 543-551.
- Maurel, C. (2007). Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *Febs Letters*, 581(12), 2227-2236.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D. T., and Santoni, V. (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 595-624.
- Medini, M., Baum, M., and Hamza, S. (2009). Transcript accumulation of putative drought responsive genes in drought-stressed chickpea seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 8(18).



- Melloul, M., Iraqi, D., Udupa, S. M., Erba, G., El Alaoui, M. A., Ibriz, M., and El Fahime, E. (2013). Analysis of mRNA Levels of Ten Genes Under Water Stress in *Triticum turgidum* subsp. *durum*. *Journal of Plant Studies*, 3(1), p65.
- Neufeld, H. S., Chappelka, A. H., Somers, G. L., Burkey, K. O., Davison, A. W., and Finkelstein, P. L. (2006). Visible foliar injury caused by ozone alters the relationship between SPAD meter readings and chlorophyll concentrations in cutleaf coneflower. *Photosynthesis research*, 87(3), 281-286.
- PARWATA, I., Indradewa, D., Yudono, P., Kertonegoro, B. D., and Kusmarwiyah, R. (2012). Physiological responses of *Jatropha* to drought stress in Coastal Sandy Land condition. *Makara J Sci*, 16(2), 115-121.
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., and Perrotta, C. (2006). Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, cell & environment*, 29(12), 2143-2152.
- Rana, R. M., Rehman, S. U., Ahmed, J., & Bilal, M. (2013). A comprehensive overview of recent advances in drought stress tolerance research in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian J. Agri. Biol*, 1, 29-37.
- Ratiba, B., Abdelhamid, D., Susan, D., and Nadia, Y. (2013). Caractérisation moléculaire et association marqueur SSR phénotype pour la tolérance au stress hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). *European Scientific Journal*, 9(12).
- Ricardi, M. M., González, R. M., Zhong, S., Domínguez, P. G., Duffy, T., Turjanski, P. G., and Iusem, N. D. (2014). Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato ASR1, a drought stress-responsive transcription factor. *BMC plant biology*, 14(1), 29.
- Rizza, F., Ghashghaie, J., Meyer, S., Matteu, L., Mastrangelo, A. M., and Badeck, F. W. (2012). Constitutive differences in water use efficiency between two durum wheat cultivars. *Field Crops Research*, 125, 49-60.
- Rorat, T. (2006). Plant dehydrins—tissue location, structure and function. *Cellular & molecular biology letters*, 11(4), 536-556.
- Santos, A. B. D., and Mazzafera, P. (2013). Aquaporins and the control of the water status in coffee plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(2), 79-93.
- Sassi, K., Abid, G., Jemni, L., Dridi-Al Mohandes, B., and Boubaker, M. (2012). Étude comparative de six variétés de blé dur (*Triticum durum*. Desf.L) vis-à-vis du stress hydrique. *Journal of Animal & Plant Science*, 15(2), 2157-2170.
- Sayar, R., Khemira, H., Kameli, A., and Mosbahi, M. (2008). Physiological tests as predictive appreciation for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Agronomy research*, 6(1), 79-90.
- Silva, M. D. A., Jifon, J. L., Da Silva, J. A., and Sharma, V. (2007). Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(3), 193-201.
- Smith, K., and Bavel, M. (2007). Response of Plants to Salt and Water Stress and the Roles of Aquaporins. *Plant Stress and Biotechnology*, 90-104.
- Suga, S., Komatsu, S., and Maeshima, M. (2002). Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant and cell physiology*, 43(10), 1229-1237.
- Talamè, V., Ozturk, N. Z., Bohnert, H. J., and Tuberosa, R. (2007). Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 229-240.
- Tyerman, S. D., Niemietz, C. M., and Bramley, H. (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 173-194.
- Vaseva, I. I., Anders, I., and Feller, U. (2014). Identification and expression of different dehydrin subclasses involved in the drought response of *Trifolium repens*. *Journal of plant physiology*, 171(3), 213-224.
- Vinocur, B., and Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 123-132.
- Wise, M. J., and Tunnacliffe, A. (2004). POPP the question: what do LEA proteins do?. *Trends in plant science*, 9(1), 13-17.
- Yamada, S., Komori, T., Myers, P. N., Kuwata, S., Kubo, T., and Imaseki, H. (1997). Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant and cell Physiology*, 38(11), 1226-1231.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 781-803.
- Ykhlef, N., and Djekoun, A. (2000). Adaptation photosynthétique et résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum turgidum* L. var. *durum*): Analyse de la variabilité génotypique. *Options Mediterr.*, 40, 327-330.
- Zhang, Y., Wang, Y., Jiang, L., Xu, Y., Wang, Y., Lu, D., and Chen, F. (2007). Aquaporin JcPIP2 is involved in drought responses in *Jatropha curcas*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(10), 787-794

## Résumés des communications

Hamla, C., & Ykhlef, N. (2013). Caractérisation des gènes de tolérance à la sécheresse chez le blé dur : étude du rôle des déhydrines et des aquaporines. Les 1<sup>ère</sup> doctorales de l'Université de Constantine 1. Université Constantine 1, Mars 2-7. Lauréate de la filière : Biologie Végétale et Ecologie.

Caractérisation des gènes de tolérance a la sécheresse chez le blé dur étude du rôle des déhydrines et des aquaporines

**Hamla Chourouk**<sup>1</sup>, Ykhlef Nadia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire de Biochimie, Génétique et Biotechnologie Végétale, Université Constantine 1, Route Ain El Bey, Constantine, Algérie*  
[h.chourouk@hotmail.com](mailto:h.chourouk@hotmail.com)

### Résumé

La sécheresse constitue l'une des contraintes environnementales les plus répandues et les plus limitantes en terme de rendement et de productivité des grandes cultures. La compréhension des mécanismes moléculaires de tolérance au stress hydrique est primordiale afin d'améliorer la tolérance des céréales et notamment du blé. Il existe plusieurs gènes pouvant être induits par un stress hydrique fonctionnellement parlant les produits de ces gènes sont le plus souvent des osmoprotectants, des facteurs de protection des macromolécules (LEA, déhydrines), des protéines membranaires (aquaporines), des enzymes de détoxification et des protéases. Les déhydrines sont des hydrophyllines jouant un rôle important dans la stabilisation des protéines et dans l'amélioration de la tolérance au stress hydrique chez le blé. Quant aux aquaporines, il s'agit de protéines transmembranaires représentant des composants cellulaires significatifs dans le transport cellulaire de l'eau à travers les membranes. Au cours de notre travail, deux expérimentations ont été conduites, une expérimentation sous serre et une expérimentation en laboratoire par application d'une contrainte hydrique artificielle suite à l'addition de PEG en culture hydroponique. Divers paramètres ont été considérés tels que : la résistance stomatique, la température foliaire, la conductivité électrolytique, le dosage des sucres totaux ou encore l'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE des protéines thermostables. Les données issues de ce premier volet ont été analysées en conséquent. Dans un second lieu la quantification des transcrits de déhydrines et d'aquaporines ainsi que leur fluctuation lors du stress hydrique a été ciblée chez deux variétés en particulier.

Mots clés: Blé dur, stress hydrique, PEG, déhydrine, aquaporine, mécanismes de tolérances.



Hamla, C., & Ykhlef, N.(2013). Variation of dehydrins and aquaporins expression in durum wheat and mechanisms of tolerance to water stress. Journées Scientifiques 2013 : Biotechnologie Végétale Maitrise et Application. Université Constantine 1, Mai 14-15.

Variation of dehydrins and aquaporins expression in durum wheat and mechanisms of tolerance to water stress.

**Hamla Chourouk<sup>1</sup>, Ykhlef Nadia<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratoire de Biochimie, Génétique et Biotechnologie Végétale, Université Constantine 1, Route Ain El Bey, Constantine, Algérie*  
[h.chourouk@hotmail.com](mailto:h.chourouk@hotmail.com)

## **Abstract**

The abiotic stresses, including drought, are the most limiting constraints for crop production, especially in a context of a global climate change. As sessile organism, plants have developed adaptive strategies to cope with those constraints by setting up a range of changes. These changes appear through multiple physiological mechanisms at the cellular, tissue and whole plant level. There is a strong connection between the modifications that occurs on the molecular, cellular level as well as on the physiological level. Plant response rely on the expression of several genes, the outcome is a modification in the transcriptional programs leading to an up or down regulation of some proteins or a synthesis of a new set of proteins. Among the numerous transcripts and proteins that accumulate during drying, the dehydrins are assumed to play a protecting role. Also another group of proteins called aquaporins turns out to be involved in drought tolerance mechanisms. The aim of our work was to perform a comparative analysis of Algerian durum wheat genotype response to drought at physiological and molecular level by focusing on two stress responsive genes. At the physiological level the characterization of genotypes responses to water stress was analyzed through several indices such: germination rate, leaf and root length, dry mass, relative water content, leaf temperature, stomatal conductance, chlorophyll content, electrolyte leakage, sugar content. Also a 1D SDS-PAGE of heat stable proteins was performed. Data collected from this section are analyzed in consequence. Expression level of an aquaporin gene and a dehydrin gene were also investigated under different drought conditions in two durum wheat varieties.

**Key words:** Durum wheat, drought stress, PEG, dehydrins, aquaporins, tolerance mechanisms.

Hamla, C., & Ykhlef, N.(2014). Effects of drought stress on physiological and biochemical indices of wheat varieties. Séminaire International des Sciences Alimentaires. INTA, Constantine, Octobre 14-16.

Effects of drought stress on physiological and biochemical indices of Algerian wheat varieties

**Hamla Chourouk<sup>1</sup>**, Ykhlef Nadia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire de Biochimie, Génétique et Biotechnologie Végétale, Université Constantine 1, Route Ain El Bey, Constantine, Algérie*  
[h.chourouk@hotmail.com](mailto:h.chourouk@hotmail.com)

**Abstract :**

Water stress is a wide world problem limiting as well crop productivity and quality all over the world and resulting in substantial loss. This is accentuated by the global climate change. Alteration of gene expression is always involved as a path followed by plants to respond to stress. An assortment of genes with diverse functions is induced by stress, these gene products result in changes at different levels of organization. Five durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes have been used in our experiment. The main objective was to perform a comparative analysis between patterns of protein extracts of durum wheat seedlings subjected to drought stress. As a response to water limitation the studied genotypes showed changes concerning the accumulation of revealed protein in terms of molecular weight and intensity. As well as a decrease of relative water content and chlorophyll content.

**Key words:** Drought stress, durum wheat, relative water content, spad index, SDS- protein markers.

Hamla, C., & Ykhlef, N. (2015). Caractérisation des gènes de tolérance à la sécheresse chez le blé dur. Les doctorales 2015. Université des frères Mentouri, Constantine, Avril 21. Lauréate de la filière : Biologie Végétale et Ecologie.

Caractérisation des gènes de tolérance a la sécheresse chez le blé dur étude du rôle des déhydrines et des aquaporines

**Hamla Chourouk**<sup>1</sup>, Ykhlef Nadia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire de Biochimie, Génétique et Biotechnologie Végétale, Université des frères Mentouri,, Route Ain El Bey , Constantine, Algérie*  
[h.chourouk@hotmail.com](mailto:h.chourouk@hotmail.com)

## Résumé

La compréhension des mécanismes moléculaires de tolérance au stress hydrique chez les céréales et notamment chez le blé demeure primordiale. En tant qu'organisme sessile, les plantes ont développé diverses stratégies adaptatives afin de pallier aux effets néfastes du stress. Ces stratégies adaptatives induisant des modifications dans les programmes transcriptionnels aboutissant à une régulation positive ou négative de certaines protéines ou encore à la synthèse de nouvelles protéines. Parmi les nombreux transcrits s'accumulant lors de la déshydratation, ceux des déhydrines, exerçant un rôle de protection. Un autre groupe de protéines également impliquées dans les mécanismes de tolérance au stress, les aquaporines. L'objectif de ce travail étant de réaliser une étude comparative du comportement de quelques variétés de blé dur en réponse au stress hydrique au niveau physiologique et biochimique et au niveau moléculaire en se focalisant sur le profil d'expression de deux gènes de réponse au stress. Au niveau physiologique et biochimique la caractérisation de la réponse des génotypes a été effectuée en s'appuyant sur différents indices: la capacité de germination, la matière sèche, la teneur relative en eau, la température foliaire, le taux de chlorophylle, la conductance stomatique, le taux d'électrolyte, la teneur en sucres, etc. Une électrophorèse en 1D SDS-PAGE des protéines thermostables a également été réalisée. Les différences observées concernant les bandes protéiques révélées se traduisent en termes de poids moléculaire et d'intensité. Une analyse du niveau d'expression d'un gène déhydrine (DHN5) et d'un gène aquaporine (TdPIP2,1) a été réalisée sur différents tissus. L'expression du gène DHN n'a pas été induite chez les plantes contrôles mais uniquement chez les plantes stressées. Tandis que, l'expression du gène AQP a été observée pour les deux lots de plantes, mais dans une plus grande mesure chez les stressées. Il existe une connexion solide entre les modifications qui se produisent au niveau physiologique et cellulaire et celles qui se produisent au niveau moléculaire. La mise en évidence d'une relation entre les gènes de réponse au stress simultanément exprimés fournit des données d'une grande importance.

Mots clés: Blé dur, stress hydrique, PEG, déhydrine, aquaporine, mécanismes de tolérance.

*|Conclusion générale et  
perspectives*

### Conclusion générale

La réponse des plantes à la sécheresse, est un terme regroupant un ensemble de processus complexes et coordonnés, dont le déterminisme moléculaire reste largement inconnu. Elle est, et elle sera encore le centre d'intérêt de nombreuses investigations.

La présente étude s'est fixée comme principal objectif, de réaliser une analyse comparative des critères morphophysologiques de tolérance à la sécheresse chez des variétés de blé dur algériennes, en se focalisant sur le profil d'expression de deux gènes de réponse au stress hydrique. Les expérimentations entreprises se sont déroulées sous serre et en chambre de culture. Le stress hydrique fut imposé suivant deux procédures : par un arrêt de l'apport en eau et par l'application d'un stress hydrique osmotique à l'aide du PEG-6000.

La contrainte osmotique imposée entraîne invariablement un ralentissement du phénomène de germination en présence du PEG-6000. Un effet qui tend à s'accroître avec l'augmentation de la pression osmotique. De même qu'une diminution de la capacité de germination ainsi qu'une augmentation du ratio LR/LF. La réduction de la capacité de germination en présence du polyéthylène glycol, a été considérée comme étant la résultante de l'abaissement du potentiel hydrique du milieu extérieur. Ce qui entraîne une difficulté, voire une inhibition de la prise d'eau par la graine.

Les expérimentations conduites ont fait ressortir un effet significatif du stress hydrique se traduisant par : une baisse du contenu en chlorophylle, de la conductance stomatique, de la matière sèche, de la teneur relative en eau, de même qu'il entraîne une accumulation de sucres solubles et une augmentation du taux d'électrolytes, dans des proportions variables entre variétés. Et ce quelle que soit la procédure expérimentale employée pour l'application de la contrainte hydrique. L'ensemble des critères choisis pour analyser la réponse des différentes variétés au stress hydrique semble être parfaitement fiable à cet effet, à l'exception de l'emploi du thermomètre à infrarouge pour l'investigation des températures foliaires, dont les valeurs ne semblent pas être suffisamment discriminantes sous conditions contrôlées, suite à l'application du polyéthylène glycol. Le maintien d'un statut hydrique favorable, couplé à une bonne capacité d'ajustement osmotique, peut contribuer substantiellement dans la tolérance à la sécheresse. Le degré de stabilité membranaire peut être évalué à travers le taux d'électrolytes cellulaires, dont la valeur relative est proportionnelle au degré de dommage affectant les membranes. Les stratégies adaptatives mises en place ne sont pas strictement exclusives ; au lieu de rentrer dans une seule catégorie, les réponses adoptées sont à même, à se combiner chez la même variété. A titre d'exemple la variété Belioni : en

## Conclusion générale et perspectives

maintenant une bonne TRE en conditions limitantes, elle allie une stratégie d'évitement avec celle de la tolérance, clairement mise en relief via l'analyse d'expression.

L'expression moléculaire de deux gènes de réponses au stress hydrique, le gène DHN-5 et le gène TdPIP2 ; 1, a été évaluée chez deux des variétés de blé dur testées : Waha et Beliouni. Le gène TdPIP2 ; 1 s'exprime aussi bien en conditions contrôlées qu'en conditions limitantes ainsi qu'au niveau foliaire et racinaire. L'expression de ce gène peut être induite de manière constitutive en fonction des besoins de la plante et des stades de développement et non pas uniquement en réponse à un stress. L'application du stress hydrique a entraîné une régulation positive de ce gène, en particulier chez la variété locale Beliouni, chez laquelle, il se trouve être plus fortement exprimé en conditions de stress. Une régulation positive, est supposée entraîner une augmentation de la perméabilité membranaire, afin de faciliter le flux d'eau et contrôler le statut hydrique.

Les niveaux des transcrits du gène DHN-5 sont, eux aussi, induits aussi bien au niveau foliaire que racinaire. Toutefois le gène DHN-5 ne s'exprime guère chez les plantes témoins des deux variétés de blé dur, mais uniquement en conditions limitantes. Ceci s'avère consistant avec un rôle de protection adopté par les plantes en réponse à un stress hydrique. L'expression de gènes DHNs dans les tissus stressés, peut entraîner la mise en place des mécanismes de tolérance, en induisant des réponses cellulaires appropriées, afin de prévenir les dommages causés par la déshydratation. Là encore, la variété Beliouni présente une plus grande accumulation des transcrits DHN-5.

Les données recueillies sur le plan moléculaire, restent compatibles avec celles mises en évidence lors de la caractérisation physiologique et biochimique des deux génotypes étudiés. La variété Beliouni présentant un meilleur statut hydrique et une bonne activité physiologique, lors de la contrainte hydrique imposée, comparativement à Waha. De même que l'accumulation des protéines thermostables (DHNs), se trouve être positivement régulée par le stress et elle est plus importante et se met en place plus rapidement chez cette dernière. Les principaux gènes impliqués dans la tolérance au stress abiotique, sont présents chez toutes les plantes, mais l'aptitude de ces dernières à la tolérance reste proportionnelle à l'efficacité de la réponse engendrée.

Notre étude suggère que les variétés Waha et Beliouni constituent un bon système d'analyse des événements moléculaires. Mais aussi que le blé dur possède la capacité à ajuster l'expression des gènes DHN-5 et TdPIP2 ; 1 selon les conditions de l'environnement

## Conclusion générale et perspectives

extérieur. L'augmentation de l'expression de ces deux gènes de réponse au stress dans différents tissus de la plante, peut-être d'une grande importance, pour la mise en place de mécanismes de tolérance entraînant ainsi une réponse cellulaire appropriée.

### Perspectives

La problématique du stress hydrique est une réalité qui possède encore beaucoup de beaux jours devant elle, en raison du contexte climatique changeant mais aussi de la complexité de la réponse d'adaptation. Lorsque l'on sait que l'adaptation au stress hydrique, est un phénomène à caractère multigénique, on se dit inévitablement, qu'insérer un seul gène ne va pas modifier littéralement les choses. Mais identifier les réseaux de gènes simultanément exprimés en condition de stress et en particulier les gènes impliqués dans la régulation de l'expression d'autres gènes de réponse au stress peut s'avérer extrêmement avantageux.

Notre investigation peut être considérée comme un point de départ pour d'autres analyses plus élaborées, portant sur les réseaux de régulation DHN-Gène de réponse au stress et ce, afin de déterminer si le gène DHN-5 agit de manière ciblée, sur un gène AQP en étant impliqué dans la régulation de son expression. Mais encore, sur quel autre gène peut-il agir. L'identification des connexions existantes entre les gènes de réponses au stress qui sont positivement régulées, peut-être extrêmement utile et peut servir comme base de départ à différentes approches biotechnologiques.

A cet effet, on peut envisager une suppression de l'expression de la protéine DHN-5 par la technique ARN interférence (ARNi), afin de vérifier les niveaux d'expression du gène TdPIP2,1 au niveau des plantes 'DHN-5-silenced' en comparaison aux plantes contrôles 'white type'. On pourrait également entreprendre d'analyser les gènes cibles potentiellement régulés par la DHN-5 qu'il s'agisse du gène TdPIP2,1 ou d'autres gènes. Pour ce faire, on peut faire appel à la stratégie ChIP-sequencing (ChIP-seq) qui combine à la fois une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) avec un séquençage parallèle massif de l'ADN, afin d'identifier *in vivo* les sites de liaison de l'ADN et de n'importe quelle protéine nucléaire.

## *Références bibliographiques*



## Références bibliographiques

### Références bibliographiques :

- **Abdellaoui, R., Tarhouni, M., Chaabane, R., Naceur, M. B., Faleh, M. E., Abdelli, C., Ramla, D., Nada, A., Sakr, M., & Hmida, J. B.** (2010). Behavior of tunisian local barley accessions under progressive water deficit: physiological and biochemical approaches. *J. Phytol*, 2(11), 88-97.
- **Abis, S.** (2012). Le blé en Méditerranée: sociétés, commerce et stratégies. 241.
- **Agarie, S., Hanaoka, N., Kubota, F., Agata, W., Kaufman, P. B., 東江栄, & 縣和一.** (1995). Measurement of cell membrane stability evaluated by electrolyte leakage as a drought and heat tolerance test in rice (*Oryza sativa* L.). *九州大学農学部紀要*, 40(1), 233-240.
- **Aharon, R., Shahak, Y., Wininger, S., Bendov, R., Kapulnik, Y., & Galili, G.** (2003). Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *The Plant Cell Online*, 15(2), 439-447.
- **Ahmad, S., Ahmad, R., Ashraf, M. Y., Ashraf, M., & Waraich, E. A.** (2009). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to drought stress at germination and seedling growth stages. *Pak. J. Bot*, 41(2), 647-654.
- **Ahuja, I., de Vos, R. C., Bones, A. M., & Hall, R. D.** (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in plant science*, 15(12), 664-674.
- **Alaei, M., Zaefizadeh, M., Khayatnezhad, M., Alaei, Z., & Alaei, Y.** (2010). Evaluation of germination properties of different durum Wheat genotypes under osmotic stress. *Middle-East J. Sci. Res*, 6(6), 642-646.
- **Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjövall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., Johanson, U., & Kjellbom, P.** (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant molecular biology*, 59(3), 469-484.
- **Allagulova, C. R., Gimalov, F. R., Shakirova, F. M., and Vakhitov, V. A.** (2003). The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Moscow)*, 68(9), 945-951.
- **Almeida-Rodriguez, A. M., Cooke, J. E., Yeh, F., and Zwiazek, J. J.** (2010). Functional characterization of drought-responsive aquaporins in *Populus balsamifera* and *Populus simonii* × *balsamifera* clones with different drought resistance strategies. *Physiologia plantarum*, 140(4), 321-333.

## Références bibliographiques

- **Almeselmani, M., Abdullah, F., Hareri, F., Naaesan, M., Ammar, M. A., ZuherKanbar, O., & Saud, A. A.** (2011). Effect of Drought on Different Physiological Characters and Yield Component in Different Varieties of Syrian Durum Wheat. *Journal of Agricultural Science*, 3(3), p127.
- **Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W.** (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026-2032.
- **Antolin, M. C., & Sánchez-Díaz, M.** (1992). Effects of temporary droughts on photosynthesis of alfalfa plants. *Journal of Experimental Botany*, 44(8), 1341-1349.
- **Anzala, F. J.** (2006). *Contrôle de la vitesse de germination chez le maïs (Zea mays): étude de la voie de biosynthèse des acides aminés issus de l'aspartate et recherche de QTLs* (Thèse Doct, Université d'Angers).
- **Aprile, A., Havlickova, L., Panna, R., Marè, C., Borrelli, G. M., Marone, D., Perotta, C., Rampino, P., De Bellis, L., Curn, V., Matrangelo, A., M., Rizza, F., & Cattivelli, L.** (2013). Different stress responsive strategies to drought and heat in two durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency. *BMC genomics*, 14(1), 821.
- **Aroca, R., Ferrante, A., Vernieri, P., and Chrispeels, M. J.** (2006). Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of botany*, 98(6), 1301-1310.
- **Arora, R., Pitchay, D. S., & Bearce, B. C.** (1998). Water-stress-induced heat tolerance in geranium leaf tissues: A possible linkage through stress proteins?. *Physiologia Plantarum*, 103(1), 24-34.
- **Arumingtyas, E. L., Savitri, E. S., & Purwoningrahayu, R. D.** (2013). Protein Profiles and Dehydrin Accumulation in Some Soybean Varieties (*Glycine max* L. Merr) in Drought Stress Conditions. *American Journal of Plant Sciences*, 4(1).
- **Assmann, S. M., Snyder, J. A., & Lee, Y. R. J.** (2000). ABA-deficient (*aba1*) and ABA-insensitive (*abi1-1*, *abi2-1*) mutants of *Arabidopsis* have a wild-type stomatal response to humidity. *Plant, Cell & Environment*, 23(4), 387-395.
- **Atkinson, N. J.** (2011). *Plant molecular response to combined drought and nematode stress*. University of Leeds. 2-8.
- **Atteya, A. M.** (2003). Alteration of water relations and yield of corn genotypes in response to drought stress. *Bulg. J. Plant Physiol*, 29(1-2), 63-76.

## Références bibliographiques

- **Ayadi, M., Cavez, D., Miled, N., Chaumont, F., and Masmoudi, K.** (2011). Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) and their role in abiotic stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(9), 1029-1039.
- **Azarnivand, H., Souri, M. O. N. A., & Etemad, V.** (2007). Effect of water stress on seed germination of *Artemisia spicigera* & *Artemisia fragrans*. *Biaban*, 12, 17-21.
- **Baaziz, K. B.** (2011). *Modulation de la conductivité hydraulique foliaire par la lumière chez le Noyer (Juglans regia): approches écophysiological et moléculaire* (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
- **Bagard, M.** (2008). *Impact de l'ozone sur les processus photosynthétiques et photorespiratoires du peuplier (Populus x canescens [Aiton] Sm.) au cours du développement foliaire Aspects écophysiological et cellulaires* (Doctoral dissertation, Nancy 1).
- **Baiges, I., Schäffner, A. R., Affenzeller, M. J., & Mas, A.** (2002). Plant aquaporins. *Physiologia Plantarum*, 115(2), 175-182.
- **Bajji M., Lutts S., Kinet J M., 2001.** Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf). Cultivars performing differently in arid conditions. 'Plant Science', 160(4), 669-681.
- **Bakalova, S., Nedeva, D., & Mckee, J.** (2008). Protein profiles in wheat seedlings subjected to dehydration stress. *Applied ecology and environmental research*, 6, 37-48.
- **Baker, J., Van dennSteele, C., & Dure III, L.** (1988). Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*, 11(3), 277-291.
- **Baloch, M. J., Dunwell, J., Khakwani, A. A., Dennett, M., Jatoi, W. A., & Channa, S. A.** (2012). Assessment of wheat cultivars for drought tolerance via osmotic stress imposed at early seedling growth stages. *Journal of Agricultural Research*, 50(3), 299-310.
- **Bammoun, A.** (1997). Contribution à l'étude de quelques caractères morphophysiological, biochimiques et moléculaires chez des variétés de blé dur, *Triticum turgidum* esp. Durm, pour l'étude de la tolérance à la sécheresse dans la région des hauts plateaux de l'ouest Algérien. Thèse de Magistère, 1-33.
- **Barrs, H. D.** (1968). Determination of water deficits in plant tissues. In T. T. Kozlowski, *Water Deficits and Plant Growth, Vol. 1*, 235-368.

## Références bibliographiques

- **Bartels, D., & Souer, E.** (2004). Molecular responses of higher plants to dehydration. In *Plant responses to abiotic stress* (9-38). Springer Berlin Heidelberg.
- **Bartels, D., Phillips, J., & Chandler, J.** (2006). Gene expression, pathways and regulation of gene expression. *Dessication tolerance chapter book*. 5:115-148.
- **Bates, B., Kundzewicz, Z. W., Wu, S., & Palutikof, J.** (2008). *Climate change and water*. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).
- **Batlang, U.** (2010). *Identification of Drought-Responsive Genes and Validation for Drought Resistance in Rice* (Doctoral dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University). 3-18.
- **Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A.** (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148(1), 6-24.
- **Bataillon, T., Chanteret, N., Cenci, A., M. E., Gautier.** (2006). Impact d'événements démographique et sélectifs sur la diversité des plantes cultivées : apport de l'analyse du polymorphisme allié à la théorie de la coalescence. *Les actes du BRG*, 6, 243-257.
- **Bayoumi, T. Y., Eid, M. H., & Metwali, E. M.** (2008). Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 7(14).
- **Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., & Bhattarai, T.** (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of biosciences*, 32(3), 501-510.
- **Ben Salem M, Slama A, Zid.** (2005). La proline est-elle un osmorégulateur chez le blé dur ? Communication aux 15<sup>es</sup> Journées biologiques, Forum des sciences biologiques, Association tunisienne des sciences biologiques.
- **Benbelkacem, A., & Kellou, K.** (2001). Évaluation du progrès génétique chez quelques variétés de blé dur (*Triticum turgidum* L. var. durum) cultivées en Algérie. *Options méditerranéennes*, 6, 105-10.
- **Bennaceur, M. B., Gharbi, M. S., & Paul, R.** (1999). L'amélioration variétale et les autres actions contribuant à la sécurité alimentaire en Tunisie, en matière de céréales. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 10(1), 27-33.

## Références bibliographiques

- **Benseddik, B., & Benabdelli, K.** (2000). Impact du risque climatique sur le rendement du blé dur (*Triticum durum* Desf.) en zone semi-aride: approche éco-physiologique. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 11(1), 45-51.
- **Bernacchia, G., & Furini, A.** (2004). Biochemical and molecular responses to water stress in resurrection plants. *Physiologia plantarum*, 121(2), 175-181.
- **Bertrand, G.** (2009). *Caractérisation des réponses adaptatives à la contrainte hydrique dans le Sud-Est de l'Amazonie chez trois espèces fourragères cultivées en monoculture et en association: brachiaria brizantha, Leucaena leucocephala et Arachis pintoï* (Doctoral dissertation, Université Paris-Est). 43-51.
- **Bewley, J. D.** (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9(7), 1055.
- **Bewley, J. D., & Black, M.** (1994). Cellular events during germination and seedling growth. In *Seeds* (pp. 147-197). Springer US.
- **Bhargava, S., and Sawant, K.** (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, 132(1), 21-32.
- **Bohnert, H. J., & Sheveleva, E.** (1998). Plant stress adaptations—making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(3), 267-274.
- **Bonhomme, L., Monclus, R., Vincent, D., Carpin, S., Claverol, S., Lomenech, A. M., Labas, V., Plomion, C., Brignolas, F., & Morabito, D.** (2009). Genetic variation and drought response in two *Populus euramericana* genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants. *Phytochemistry*, 70(8), 988-1002.
- **Bots, M., Feron, R., Uehlein, N., Weterings, K., Kaldenhoff, R., & Mariani, T.** (2005). PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *Journal of experimental botany*, 56(409), 113-121.
- **Boubaker, M., & Yamada, T.** (1995). Differential genotypic responses of spring wheat early seedling growth to limited moisture conditions. *Tropicultura (Belgium)*.
- **Boucher, V.** (2009). *Caractérisation fonctionnelle de MtPM25, une protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant), et implication dans la qualité germinative des graines de Medicago truncatula* (Doctoral dissertation, Université d'Angers). 31-51.
- **Bousba, R.** (2006). Effet d'une contrainte abiotique (stress hydrique) sur les composants

## Références bibliographiques

- **Bousbaa, R.** (2013). Caractérisation de la tolérance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum durum*, Desf.) : Analyse de la physiologie et de la capacité en production. Thèse Doc. Univ Mentouri Constantine. 55-80.
- **Bray, E. A.** (1994). Alterations in gene expression in response to water deficit. *Stress-induced gene expression in plants*, 1-23.
- **Bray, E. A.** (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*, 2(2), 48-54.
- **Bray, E. A.** (2004). Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55(407), 2331-2341.
- **Brini, F., Hanin, M., Lumbreras, V., Irar, S., Pages, M., & Masmoudi, K.** (2007). Functional characterization of DHN-5, a dehydrin showing a differential phosphorylation pattern in two Tunisian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties with marked differences in salt and drought tolerance. *Plant science*, 172(1), 20-28.
- **Brini, F., Saibi, W., Amara, I., Gargouri, A., Masmoudi, K., & Hanin, M.** (2010). Wheat dehydrin DHN-5 exerts a heat-protective effect on b-glucosidase and glucose oxidase activities. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74, 1050-1054.
- **Brini, F., Yamamoto, A., Jlaiel, L., Takeda, S., Hobo, T., Dinh, H. Q., & Hanin, M.** (2011). Pleiotropic effects of the wheat dehydrin DHN-5 on stress responses in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology*, 52(4), 676-688.
- **Bruce, W. B., Edmeades, G. O., & Barker, T. C.** (2002). Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 13-25.
- **Campbell, S. A., & Close, T. J.** (1997). Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytologist*, 137(1), 61-74.
- **Carjuzaa, P., Castellón, M., Distéfano, A. J., Del Vas, M., & Maldonado, S.** (2008). Detection and subcellular localization of dehydrin-like proteins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) embryos. *Protoplasma*, 233(1-2), 149-156.
- **Cattivelli, L., Ceccarelli, S., Romagosa, I., & Stanca, M.** (2010). Abiotic stresses in barley: problems and solutions. *Barley: improvement, production, and uses*. Wiley, Harrisonburg, 282-306.
- **Ceccardi, T. L., Meyer, N. C., & Close, T. J.** (1994). Purification of a maize dehydrin. *Protein expression and purification*, 5(3), 266-269.

## Références bibliographiques

- **Cechin, I., Rossi, S. C., Oliveira, V. C., & Fumis, T. F.** (2006). Photosynthetic responses and proline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit. *Photosynthetica*, 44(1), 143-146.
- **Cellier, F., Conéjéro, G., Breitler, J. C., & Casse, F.** (1998). Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower accumulation of dehydrin transcripts correlates with tolerance. *Plant Physiology*, 116(1), 319-328.
- **Charles, M.** (2010). *Evolution des génomes du blé (genres aegilops et Triticum) au sein des Poaceae: dynamique rapide de l'espace occupé par les éléments transposables et conservation relative des gènes* (Doctoral dissertation, Evry-Val d'Essonne). p8.
- **Chatelain, L. (2007).** LEA-DB: Base de données et site Web dédiés à l'étude des LEA. 11-24.
- **Chaumeil, P.** (2006). *Plasticité moléculaire de deux écotypes de pin maritime soumis à un stress osmotique* (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy I). 22-52.
- **Chaumont, F.** (2010). Les mouvements de l'eau dans les organismes vivants: l'exemple de la plante Communication présentée au colloque: «Or bleu, indispensable, inodore et sans saveur», Institut de mathématique de l'Université de Liège, le vendredi 3 décembre 2010. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*.
- **Chaumont, F., & Tyerman, S. D.** (2014). Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant physiology*, 164(4), 1600-1618.
- **Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M. J., & Jung, R.** (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology*, 125(3), 1206-1215.
- **Chaumont, F., Moshelion, M., & Daniels, M. J.** (2005). Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell*, 97(10), 749-764.
- **Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S.** (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), 239-264.
- **Chefdor, F.** (2006). *Recherche d'un phosphorelais multiple impliqué dans la perception et la transduction du signal stress hydrique chez le peuplier* (Doctoral dissertation, Orléans).
- **Cheng Z, Targolli J, Huang X, Wu R.** (2002). Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breed.* 10, 71–82.



## Références bibliographiques

- **Cherfia, R.** (2010). Etude de la variabilité morpho-physiologique et moléculaire d'une collection de blé dur algérien (*Triticum durum*, Desf.). Mémoire Magist. Univ Mentouri Constantine. 20-26.
- **Cherian, S., Reddy, M. P., & Ferreira, R. B.** (2006). Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: progress and future prospects. *Biologia plantarum*, 50(4), 481-495.
- **Choi, D. W., Zhu, B., & Close, T. J.** (1999). The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv Dicktoo. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(8), 1234-1247.
- **Choquer, M., Boccara, M., & Vidal-Cros, A.** (2003). A semi-quantitative RT-PCR method to readily compare expression levels within *Botrytis cinerea* multigenic families in vitro and in planta. *Current genetics*, 43(4), 303-309.
- **Chrispeels, M. J., & Maurel, C.** (1994). Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells?. *Plant Physiology*, 105(1), 9.
- **Chrispeels, M. J., Crawford, N. M., & Schroeder, J. I.** (1999). Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *The Plant Cell Online*, 11(4), 661-675.
- **Christensen, C. A., & Feldmann, K. A.** (2007). Biotechnology Approaches To Engineering Drought Tolerant Crop. In *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* (pp. 333-357). Springer Netherlands.
- **Clarke, J. M., & McCaig, T. N.** (1982). Excised-leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, 62(3), 571-578.
- **Clavel, D., Drame, N. K., Diop, N. D., & Zuily-Fodil, Y.** (2005). Adaptation à la sécheresse et création variétale: le cas de l'arachide en zone sahélienne. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 12(3), 248-260.
- **Clifford, S. C., Arndt, S. K., Corlett, J. E., Joshi, S., Sankhla, N., Popp, M., & Jones, H. G.** (1998). The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *Journal of Experimental Botany*, 49(323), 967-977.
- **Close, T. J.** (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 291-296.



## Références bibliographiques

- **Close, T. J., & Chandler, P. M.** (1990). Cereal dehydrins: serology, gene mapping and potential functional roles. *Functional Plant Biology*, 17(3), 333-344.
- **Close, T. J., Choi, D. W., Campbell, S. A., Koag, M. C., & Zhu, B.** (2000). The dehydrin multigene family in the Triticeae and maize. *Production in Water-Limited Environments*, 167.
- **Close, T. J., Kortt, A. A., & Chandler, P. M.** (1989). A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant molecular biology*, 13(1), 95-108.
- **Close, T.J.** (1997). Dehydrins a commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 100:291-296.
- **Cohen, E.** (2012). Roles of aquaporins in osmoregulation, desiccation and cold hardiness in insects. *Entomol. Omithol. Herpetol.*, SI, 1, 2161-0983.
- **Concha, N., Ruiz-Lara, S., Munoz, X., Bravo, L. A., & Corcuera, L. J.** (2004). Accumulation of dehydrin transcripts and proteins in response to abiotic stresses in *Deschampsia antarctica*. *Antarctic Science*, 16(02), 175-184.
- **Danielson, J. Å., & Johanson, U.** (2008). Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*, 8(1), 45.
- **Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, & Sarhan F.** (1998). Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10, 623-638.
- **De Leonardis, A. M., Marone, D., Mazzucotelli, E., Neffar, F., Rizza, F., Di Fonzo, N., & Mastrangelo, A. M.** (2007). Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. *Plant science*, 172(5), 1005-1016.
- **De Rodríguez, D. J., Romero-García, J., Rodríguez-García, R., & Angulo-Sanchez, J. L.** (2002). Characterization of proteins from sunflower leaves and seeds: relationship of biomass and seed yield. *Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA*, 143-149.
- **Dexter, J., James.** (2008). *Plant breeding* 104: 325-333.
- **Dhanaraj, A. L., Slovin, J. P., & Rowland, L. J.** (2005). Isolation of a cDNA clone and characterization of expression of the highly abundant, cold acclimation-associated 14kDa dehydrin of blueberry. *Plant Science*, 168(4), 949-957.

## Références bibliographiques

- **Di Pietro, M.** (2011). *Régulation des aquaporines et réponse des racines d'Arabidopsis thaliana à des stimuli abiotiques et nutritionnels* (Doctoral dissertation, Montpellier, SupAgro). 8-9.
- **Dib, T. A., Monneveux, P., & Araus, J. L.** (1992). Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. II. Caractères physiologiques d'adaptation. *Agronomie*, 12(5), 381-393.
- **Dicko, P., & Mamoudou, H.** (2006). Travaux Pratiques de Biochimie Structurale et d'Enzymologie. Centre de recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles. Univ Ouagadougou.
- **Djekoun, A., & Planchon, C.** (1991). Water status effect on dinitrogen fixation and photosynthesis in soybean. *Agronomy Journal*, 83(2), 316-322.
- **Djekoun, A.** (1991). *Photosynthèse, fixation symbiotique de l'azote et résistance à la sécheresse chez le soja (Glycine max. L. Merrill)* (Doctoral dissertation).
- **Dkhil, B. B., & Denden, M.** (2012). Effect of salt stress on growth, anthocyanins, membrane permeability and chlorophyll fluorescence of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedlings. *American Journal of Plant Physiology*, 7(4), 174-183.
- **Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., & Smith, F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- **Dubos, C.** (2001). *Réponse moléculaire de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique en milieu hydroponique* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat en biologie Forestière, Université Henri Poincaré, Nancy I: 54-55).
- **Dumont, J.** (2013). *Rôle de la régulation stomatique et de la capacité de détoxification foliaire dans l'estimation d'un seuil de risque à l'ozone pour la végétation* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- **Dupont, S.** (2011). *Implication de la membrane plasmique dans la survie de Saccharomyces cerevisiae lors de perturbations hydriques: rôle clé de l'ergostérol* (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne). 5-8.
- **Durand, T.** (2009). *Approche protéomique des stress abiotiques chez Populus tremula x P. alba* (Thèse Doct, Université d'Orléans). 149-182.
- **Dure III, L., Greenway, S. C., & Galau, G. A.** (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid

## Références bibliographiques

populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, 20(14), 4162-4168.

- **Dure L III.** (1993). Structural motifs in Lea proteins. In ‘‘Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress’’ (T. J. Close and E. A. Bray, eds.), pp. 91–103. American Society of Plant Physiologists Series, USA.
- **El Jaafari, S., Paul, R., Lepoivre, P., Semal, J., & Laitat, É.** (1993). Résistance à la sécheresse et réponses à l’acide abscissique: analyse d’une approche synthétique. *Cahiers Agricultures*, 2(4), 256-263.
- **Erdei, L., Tari, I., Csiszár, J., Pécsváradi, A., Horváth, F., Szabó, M., & Györgyey, J.** (2002). Osmotic stress responses of wheat species and cultivars differing in drought tolerance: some interesting genes (advices for gene hunting). *Acta Biol Szeged*, 46(3-4), 63-65.
- **Ergen, N. Z., Thimmapuram, J., Bohnert, H. J., & Budak, H.** (2009). Transcriptome pathways unique to dehydration tolerant relatives of modern wheat. *Functional & integrative genomics*, 9(3), 377-396.
- **FAO.** (2014). <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>
- **Farissi, M., Bouizgaren, A., Faghire, M., Bargaz, A., & Ghoulam, C.** (2013). Agrophysiological and biochemical properties associated with adaptation of *Medicago sativa* populations to water deficit. *Turkish Journal of Botany*, 37(6), 1166-1175.
- **Farooq, S. & Azam, F.** (2001). Co-Existence of Salt and Drought Tolerance in Triticeae. *Hereditas*, 135(2-3), 205-210.
- **Farooq, S.** (2001). Co-Existence of Salt and Drought Tolerance in Triticeae. *Hereditas*, 135(2-3), 205-210.
- **Farrant, J. M.** (2000). A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology*, 151(1), 29-39.
- **Farshadfar, E., Haghparast, R., & Qaitoli, M.** (2008). Chromosomal Localization of the Genes Controlling Agronomic and Physiological Indicators of Drought Tolerance in Barley Using Disomic Addition Lines. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(6).
- **Feillet, P.** (2000). *Le grain de blé: composition et utilisation*. Editions Quae.
- **Feller, U.** (2006). Stomatal opening at elevated temperature: an underestimated regulatory mechanism. *General and Applied Plant Physiology. Special*, (19-31).

## Références bibliographiques

- **Fleury, D., Jefferies, S., Kuchel, H., & Langridge, P.** (2010). Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3211-3222.
- **Flexas, J., Bota, J., Galmes, J., Medrano, H., & Ribas-Carbó, M.** (2006). Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*, 127(3), 343-352.
- **Flower, D. J., & Ludlow, M. M.** (1986). Variation among accessions of pigeonpea (*Cajanus cajan*) in osmotic adjustment and dehydration tolerance of leaves. *Field Crops Research*, 17(3), 229-243.
- **Forrest, K.** (2008). *Investigation of the gene family encoding aquaporins, the protein channels regulating water movement, in wheat*. Environment and Biotechnology Centre, Faculty of Life and Social Sciences, Swinburne University of Technology.
- **Forrest, K. L., & Bhave, M.** (2010). Physical mapping of wheat aquaporin genes. *Theoretical and applied genetics*, 120(4), 863-873.
- **Forrest, K. L., & Bhave, M.** (2008). The PIP and TIP aquaporins in wheat form a large and diverse family with unique gene structures and functionally important features. *Functional & integrative genomics*, 8(2), 115-133.
- **Fotiadis, D., Hasler, L., MuÈller, D. J., Stahlberg, H., Kistler, J., & Engel, A.** (2000). Surface tongue-and-groove contours on lens MIP facilitate cell-to-cell adherence. *Journal of molecular biology*, 300(4), 779-789.
- **Fouquet, R., Léon, C., Ollat, N., & Barrieu, F.** (2008). Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. *Plant cell reports*, 27(9), 1541-1550.
- **Fraser, T. E., Silk, W. K., & Rost, T. L.** (1990). Effects of low water potential on cortical cell length in growing regions of maize roots. *Plant physiology*, 93(2), 648-651.
- **Fray, R. G., Wallace, A., Grierson, D., & Lycett, G. W.** (1994). Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant molecular biology*, 24(3), 539-543.
- **Fray, Rupert, G., & Donald Grierson.** (1993). Molecular Genetics of tomato fruit ripening. *Trends in Genetics*. 9(12), 438-443.
- **Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E.** (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26, 112-125.

## Références bibliographiques

- **Galau, G. A., & Close, T. J.** (1992). Sequences of the cotton group 2 LEA/RAB/dehydrin proteins encoded by *Lea3* cDNAs. *Plant physiology*, 98(4), 1523.
- **Galmés, J., Pou, A., Alsina, M. M., Tomàs, M., Medrano, H., & Flexas, J.** (2007). Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta*, 226(3), 671-681.
- **Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J. M., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. A.** (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5668-5674
- **Geigenberger, P., Reimholz, R., Geiger, M., Merlo, L., Canale, V., & Stitt, M.** (1997). Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta*, 201(4), 502-518.
- **George, S., Jatoi, S. A., & Siddiqui, S. U.** (2013). Genotypic differences against PEG simulated drought stress in tomato. *Pak. J. Bot*, 45(5), 1551-1556.
- **Godoy, JA., Lunar, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, RM., & Pintor Toro, JA.** (1994). Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 26, 1921-1934.
- **Goyal, K., Tisi, L., Basran, A., Browne, J., Burnell, A., Zurdo, J., & Tunnacliffe A.** (2003). Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *J. Biol. Chem.* 278, 12977-12984.
- **Goyal, K., Walton, L., & Tunnacliffe, A.** (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* 388, 151-157.
- **Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange-Macherel MH, Grunwald D, & Macherel D.** (2005). Identification in pea seed mitochondria of a late embryogenesis abundant (LEA) protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.* 137, 157-167.
- **Grezesiak, S., DE Barnaro, A., & Filek, W.** (1992). Assimilation, translocation and accumulation of C14 in two Maiz (*Zea mays* L.) hybrids of different drought tolerance. *Photosynthetica.* 27 (3): 585-593.
- **Guerrero, F. D., & Crossland, L.** (1993). Tissue-specific expression of a plant turgor-responsive gene with amino acid sequence homology to transport-facilitating proteins. *Plant molecular biology*, 21(5), 929-935.

## Références bibliographiques

- **Guerrero, F. D., Jones, J. T., & Mullet, J. E.** (1990). Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant molecular biology*, *15*(1), 11-26.
- **Guo, P., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., Bai, G., Li, R., & Valkoun, J.** (2009). Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of experimental botany*, *60*(12), 3531-3544.
- **Gupta, N. K., Agarwal, V. P., Gupta, S., Singh, G., & Purohit, A. K.** (2014). *International Journal of Applied Life Sciences and Engineering (IJALSE)*.
- **Gupta, P., Balyan, H., Edwards, K., Isaac, P., Korym, V., Roder, M. S., Gautier, M. F., Joudrier, P., Schlatter, R., Dubcovsky, De La Pena, C., Khairallah, M., Penner, G., Hayden, J., J., Sharp, P., Keller, B., Wang, C., Hardwin, P., Jack, P., & Leron, P.** (2002). Genetic mapping of 66 microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *105* (2-3), 413-422.
- **Gutierrez, L., Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C., & Van Wuytswinkel, O.** (2008). Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *The Plant Cell Online*, *20*(7), 1734-1735.
- **Hachez, C., Heinen, R. B., Draye, X., & Chaumont, F.** (2008). The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. *Plant molecular biology*, *68*(4-5), 337-353.
- **Hamayun, M., Khan, S. A., Shinwari, Z. K., Khan, A. L., Ahmad, N., & Lee, I. J.** (2010). Effect of polyethylene glycol induced drought stress on physio-hormonal attributes of soybean. *Pak J Bot*, *42*, 977-986.
- **Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., & Masmoudi, K.** (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant signaling & behavior*, *6*(10), 1503-1509.
- **Hara, M., Shinoda, Y., Tanaka, Y., & Kuboi, T.** (2010). DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant, cell & environment*, *32*(5), 532-541.
- **Hara, M., Terashima, S., & Kuboi, T.** (2001). Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu. *Journal of Plant Physiology*, *158*(10), 1333-1339.

## Références bibliographiques

- **Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T., & Kuboi, T.** (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217(2), 290-298.
- **Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J.** (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment*, 21(6), 535-553.
- **Harrouni, M. C., Zahri, S., & ElHemaïd, A.** (1995, October). Transplantation des jeunes plantules d'arganier: effet combiné de techniques culturales et du stress hydrique. In *Actes du colloque international La forêt face à la désertification «cas des Arganeraies», faculté des sciences, Agadir* (Vol. 26, No. 27, pp. 115-33).
- **Hassan, N. M., El-Bastawisy, Z. M., El-Sayed, A. K., Ebeed, H. T., & Nemat Alla, M. M.** (2013). Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. *Journal of Advanced Research*.
- **Heinen, R. B., Ye, Q., & Chaumont, F.** (2009). Role of aquaporins in leaf physiology. *Journal of Experimental Botany*, 60(11), 2971-2985.
- **Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A., & Grill, D.** (2002). Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6), 691-696.
- **Heyen, B.J., Alsheikh, MK., Smith, EA., Torvik, CF., Seals, DF. & Randall SK.** (2002). The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol.* 130, 675-687.
- **Heyser, J. W., & Nabors, M. W.** (1981). Growth, water content, and solute accumulation of two tobacco cell lines cultured on sodium chloride, dextran, and polyethylene glycol. *Plant physiology*, 68(6), 1454-1459.
- **Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., Bintink, J.** (2002). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science*, 6(9), 431\_438.
- **Höfte, H., Hubbard, L., Reizer, J., Ludevid, D., Herman, E. M., & Chrispeels, M. J.** (1992). Vegetative and seed-specific forms of tonoplast intrinsic protein in the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 99(2), 561-570.
- **Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberté, S., & Sarhan, F.** (1995). Immunolocalization of freezing tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J.* 8, 583-593.



## Références bibliographiques

- **Hundertmark, M., & Hinch, D. K.** (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*, 9(1), 118.
- **Ildikó, B.** (2013). Analysis of Structure and Function of the Intrinsically Disordered Dehydrin ERD14. 1-19.
- **Ingram, J., & Bartels, D.** (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 377-403.
- **International Seed Testing Association ISTA.** (2003). International rules for seed testing: . edition 2003/. Basserdorf,, Switzerland: International Seed Testing Association.
- **Iskandar, H. M., Casu, R. E., Fletcher, A. T., Schmidt, S., Xu, J., Maclean, D. J., Manners, J.M., & Bonnett, G. D.** (2011). Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. *BMC plant biology*, 11(1), 12.
- **Ismail, A. M., Hall, A. E., & Close, T.J.** (1999). Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol.* 120, 237-244.
- **Jajarmi, V.** (2009). Effect of water stress on germination indices in seven wheat cultivar. *World Acad. Sci. Eng. Technol*, 49, 105-106.
- **Jang, J. Y., Kim, D. G., Kim, Y. O., Kim, J. S., & Kang, H.** (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 54(5), 713-725.
- **Jaspard, E., Macherel, D., & Hunault, G.** (2012). Computational and statistical analyses of amino acid usage and physico-chemical properties of the twelve late embryogenesis abundant protein classes. *PLoS One*, 7(5), e36968.
- **Jauh, G. Y., Phillips, T. E., & Rogers, J. C.** (1999). Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *The Plant Cell Online*, 11(10), 1867-1882.
- **Jeanneau, M., Gerentes, D., Foueillassar, X., Zivy, M., Vidal, J., Toppan, A., & Perez, P.** (2002). Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the Zm-Asr1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie*, 84(11), 1127-1135.
- **Jeantet, R., Caroguennic, T., Schuk, P., & Brule, G.** (2007). Sciences des aliments. Edition Tec&Doc Lavoisier. 2: 139-150.



## Références bibliographiques

- **Jepson, S.G., & Close, T.J.** (1995). Purification of a maize dehydrin protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 6, 632-636.
- **Jiang, Y., & Huang, B.** (2002). Protein alterations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. *Crop Science*, 42(1), 202-207.
- **Johanson, U., & Gustavsson, S.** (2002). A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Molecular biology and evolution*, 19(4), 456-461.
- **Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C., & Kjellbom, P.** (2000). The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 324-342.
- **Jones, D. P.** (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10), 1865-1879.
- **Jones, H. G.** (2004). Irrigation scheduling: advantages and pitfalls of plant-based methods. *Journal of experimental botany*, 55(407), 2427-2436.
- **Kaldenhoff, R., & Fischer, M.** (2006). Functional aquaporin diversity in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(8), 1134-1141.
- **Kameli, A., & Lösel, D. M.** (1996). Growth and sugar accumulation in durum wheat plants under water stress. *New phytologist*, 132(1), 57-62.
- **Kammerloher, W., & Schaffner, A. R.** (1993). PIP—an *A. thaliana* plasma membrane MIP homologue cloned by expression in mammalian cells. In *Fifth International Conference on Arabidopsis Research*. Ohio State University, Columbus, OH (Vol. 185, pp. 1633-1639).
- **Kara, K., & Brinis, L.** (2011). Réponse Physiologique au Stress Hydrique de Variétés de Blé Tendre (*Triticum Aestivum* L.) Cultivées en Algérie. *European Journal of Scientific Research*, 81(4), 524-532.
- **Karlson, M., Johansson, I., Bush, M., M. C., Mac Caun., C. Maurel., C. Larsson., & P. Kjellbom.** 2000. An abundant TIP expressed in mature highly vacuolated cell. *The Plant Journal*. 21(1) : 83-90.
- **Katsuhara, M., Hanba, Y. T., Shiratake, K., & Maeshima, M.** (2008). Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles. *Functional Plant Biology*, 35(1), 1-14.

## Références bibliographiques

- **Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., ... & Bohnert, H. J.** (2001). Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell Online*, 13(4), 889-905.
- **Kerepesi, I., Galiba, G., & Bányai, É.** (1998). Osmotic and salt stresses induced differential alteration in water-soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(12), 5347-5354.
- **Keyvan, S.** (2010). The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *J. Anim. Plant Sci*, 8, 1051-1060.
- **Khan, H. R., Paull, J. G., Siddique, K. H., & Stoddard, F. L.** (2009). Faba bean breeding for drought-affected environments: A physiological and agronomic perspective. *Field Crops Research*, 115(3), 279-286.
- **Khayatnezhad, M., & Gholamin, R.** (2011). Effects of water and salt stresses on germination and seedling growth in two durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes. *Scientific Research and Essays*, 6(21), 4597-4603.
- **Kiani, S. P.** (2007). *Analyse génétique des réponses physiologiques du tournesol (Helianthus annuus L.) soumis à la sécheresse* (Thèse Doct, Institut National Polytechnique de Toulouse). 11-22.
- **Kirch, H. H., Vera-Estrella, R., Gollmack, D., Quigley, F., Michalowski, C. B., Barkla, B. J., & Bohnert, H. J.** (2000). Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology*, 123(1), 111-124.
- **Koag, MC., Fenton, RD., Wilkens, S., & Close, TJ.** (2003). The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiol.* 131, 309-316.
- **Kocheva, K., & Georgiev, G.** (2003). Evaluation of the reaction of two contrasting barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars in response to osmotic stress with PEG 6000. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 49, 290-294.
- **Kotchi, S. O.** (2004). Détection du stress hydrique par thermographie infrarouge. Application à la culture de la pomme de terre. Mémoire. Univ Laval Québec.
- **Kouakou, T. H., Kone, M., Kone, D., Kouadio, Y. J., & Zouzou, M.** (2008). Réponse physiologique au stade juvénile du génotype R405-2000 de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) au déficit hydrique induit par le polyéthylène glycol. *Sciences & Nature*, 5(1), 81-87.

## Références bibliographiques

- **Kruse, E., Uehlein, N., & Kaldenhoff, R.** (2006). The aquaporins. *Genome Biol*, 7(2), 206.
- **Kumar, D.** (2005). Breeding for drought resistance. *Abiotic stresses: Plant Resistance through Breeding and Molecular Approaches*, 145-175.
- **Labhili, M., Joudrier, P., & Gautier, M. F.** (1995). Characterization of cDNAs encoding Triticum durum dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Science*, 112(2), 219-230.
- **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- **Lang, V., & Palva, ET.** (1992). The expression of a rab-related gene, RAB18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.* 20, 951–962.
- **Langridge, P., Paltridge, N., & Fincher, G.** (2006). Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 4(4), 343-354.
- **Levitt, J.** (1980). Responses of plants to environmental stresses. Academic Presse, New York.
- **Li, X., Wang, X., Yang, Y., Li, R., He, Q., Fang, X., & Lin, J.** (2011). Single-molecule analysis of PIP2; 1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation. *The Plant Cell Online*, 23(10), 3780-3797.
- **Lian, H. L., Yu, X., Ye, Q., Ding, X. S., Kitagawa, Y., Kwak, S. S., Su, W.A., & Tang, Z. C.** (2004). The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant and Cell Physiology*, 45(4), 481-489.
- **Liang, Z., Zhang, F., Shao, M., & Zhang, J.** (2002). The relations of stomatal conductance, water consumption, growth rate to leaf water potential during soil drying and rewatering cycle of wheat (Triticum aestivum). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43.
- **Lisse T, Bartels D, Kalbitzer HR, & Jaenicke R.** (1996). The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state. *Biol. Chem.* 377, 555–561.

## Références bibliographiques

- **Litts, J.C., Colwell, G.W., Chakerian, R.L., & Quatrano, R.S.** (1987). The nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the wheat Em protein. *Nucleic Acids Research* 15, 3607–3618.
- **Liu, W., Fairbairn, D.J., Reid, R.J., & Schachtman, D.P.** (2001). Characterization of two HKT1 homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capability. *Plant Physiology* 127:283-294.
- **Lopez, C. G., Banowetz, G. M., Peterson, C. J., & Kronstad, W. E.** (2003). Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *Crop Science*, 43(2), 577-582.
- **Lopez, C. G., Banowetz, G., Peterson, C. J., & Kronstad, W. E.** (2001). Differential Accumulation of a 24-kd Dehydrin Protein in Wheat Seedlings Correlates with Drought Stress Tolerance at Grain Filling. *Hereditas*, 135(2-3), 175-181.
- **Loreti, E., De Bellis, L., Alpi, A., & Perata, P.** (2001). Why and how do plant cells sense sugars. *Annals of Botany*, 88(5), 803-812.
- **Lovisolo, C., Secchi, F., Nardini, A., Salleo, S., Buffa, R., & Schubert, A.** (2007). Expression of PIP1 and PIP2 aquaporins is enhanced in olive dwarf genotypes and is related to root and leaf hydraulic conductance. *Physiologia Plantarum*, 130(4), 543-551.
- **Luquet, D., Begue, A., Vidal, A., Clouvel, P., Dauzat, J., Olios, A., Gu XF & Tao, Y.** (2003). Using multidirectional thermography to characterize water status of cotton. *Remote Sensing of Environment*, 84(3), 411-421.
- **LUU, D. T., & Maurel, C.** (2005). Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell & Environment*, 28(1), 85-96.
- **Mahdieh, M., Mostajeran, A., Horie, T., & Katsuhara, M.** (2008). Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant and Cell Physiology*, 49(5), 801-813.
- **Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K. K.** (2008). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant cell reports*, 27(3), 411-424.
- **Matsuura, A., Inanaga, S., & Sugimoto, Y.** (1996). Mechanism of interspecific differences among four gramineous crops in growth response to soil drying. *Japanese Journal of Crop Science (Japan)*.
- **Maurel, C.** (1997). Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual review of plant biology*, 48(1), 399-429.

## Références bibliographiques

- **Maurel, C.** (2007). Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *Febs Letters*, 581(12), 2227-2236.
- **Maurel, C., & Chrispeels, M. J.** (2001). Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*, 125(1), 135-138.
- **Maurel, C., Santoni, V., Luu, D. T., Wudick, M. M., & Verdoucq, L.** (2009). The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Current opinion in plant biology*, 12(6), 690-698.
- **Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D. T., & Santoni, V.** (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 595-624.
- **Medini, M., Baum, M., & Hamza, S.** (2009). Transcript accumulation of putative drought responsive genes in drought-stressed chickpea seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 8(18).
- **Megherbi, A., Mehdadi, Z., Toumi, F., Moueddene, K., & Bouadjra, S. E. B.** (2012). Tolérance à la sécheresse du blé dur (*Triticum durum* Desf.) et identification des paramètres morpho-physiologiques d'adaptation dans la région de Sidi Bel-Abbès (Algérie occidentale). *Acta Botanica Gallica*, 159(1), 137-143.
- **Mele, G., & Hake, S.** (2003). Expression profiling of plant development. *Genome Biol*, 4(215), 55.
- **Melloul, M., Iraqi, D., Udupa, S. M., Erba, G., El Alaoui, M. A., Ibriz, M., & El Fahime, E.** (2014). Analysis of mRNA Levels of Ten Genes Under Water Stress in *Triticum turgidum* subsp. *durum*. *Journal of Plant Studies*, 3(1), p65.
- **Merdinoglu, M. D.** (2008). *Etude transcriptomique de la réponse de la Vigne (Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon) au champignon ascomycète vasculaire Eutypa lata, responsable de l'eutypiose* (Doctoral dissertation, Université de Poitiers).
- **Merret, R.** (2010). *Contrôle moléculaire de la croissance sous déficit hydrique: analyse cinématique et régulation de l'expression des aquaporines TIP1 dans l'apex de la racine du peuplier* (Doctoral dissertation, Nancy 1). 13-17.
- **Michaut, M.** (2008). *Analyse de données transcriptome et protéome pour l'étude des réponses aux stress oxydants et aux métaux lourds* (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).

## Références bibliographiques

- **Mitwisha, L., Brandt, W., McCready, S., & Lindsey, G. G.** (1998). HSP 12 is a LEA-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant molecular biology*, 37(3), 513-521.
- **Mohammadkhani, N., & Heidari, R.** (2008). Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Appl. Sci. J*, 3(3), 448-453.
- **Mohammadkhani, N., & Heidari, R.** (2009). Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 23-30.
- **Molnár, I., Gáspár, L., Sárvári, É., Dulai, S., Hoffmann, B., Molnár-Láng, M., & Galiba, G.** (2004). Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Functional Plant Biology*, 31(12), 1149-1159.
- **Monneveux, P., & This, D.** (1997). La génétique face au problème de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse: espoirs et difficultés. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 8(1), 29-37.
- **Moody, D. E.** (2001). Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression. *Journal of Animal Science*, 79(E-Suppl), E128-E135.
- **Mori, I. C., Rhee, J., Shibasaka, M., Sasano, S., Kaneko, T., Horie, T., & Katsuhara, M.** (2014). CO<sub>2</sub> transport by PIP2 aquaporins of barley. *Plant and Cell Physiology*, 55(2), 251-257.
- **Moud, A. M., & Maghsoudi, K.** (2008). Application of coleoptile growth response method to differentiate osmoregulation capability of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Research Journal of Agronomy*, 2(2), 36-43.
- **Mouellef, A.** (2010). Caractères physiologiques et biochimiques de tolérance du blé dur (*Triticum durum* Desf.) au stress hydrique. Magister thesis. Univ. Constantine. 14-82.
- **Mouillon, J. M., Gustafsson, P., & Harryson, P.** (2006). Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *Plant physiology*, 141(2), 638-650.
- **Mundy, J., & Chua, N. H.** (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *The EMBO Journal*, 7(8), 2279.
- **Nadjim, S.** (2007). Utilisation de la discrimination isotopique du carbone comme critère de sélection du blé dur (*triticum durum* desf ) en relation avec le bilan hydrique. (Mémoire Magister, Université de Sétif).

## Références bibliographiques

- **Ndour, P., & Danthu, P.** (1998). Effet des contraintes 1 hydrique et saline 1 sur la germination de 1 quelques acacias africains.
- **Neufeld, H. S., Chappelka, A. H., Somers, G. L., Burkey, K. O., Davison, A. W., and Finkelstein, P. L.** (2006). Visible foliar injury caused by ozone alters the relationship between SPAD meter readings and chlorophyll concentrations in cutleaf coneflower. *Photosynthesis research*, 87(3), 281-286.
- **Nouri L.** (2002). Ajustement osmotique et maintient de l'activité photosynthétique chez le blé dur Desf. En conditions de déficit hydrique. Thèse. Biologie végétale. pp381-393.
- **Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV.** (2001). Stress induced accumulation and tissue specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 45, 263–279.
- **O'Neill, P. M., Shanahan, J. F., & Schepers, J. S.** (2006). Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Science*, 46(2), 681-687.
- **Otto, B., Kaldenhoff, R.** (2000). Cell specific expression of mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 211(2), 167-172.
- **Ouellet, F., Houde, M., & Sarhan, F.** (1993). Purification, characterization and cDNA cloning of the 200 kDa protein induced by cold acclimation in wheat. *Plant and cell physiology*, 34(1), 59-65.
- **Oukarroum, A.** (2007). *Vitalité des plantes d'orge ("Hordeum vulgare" L.) en conditions de stress hydrique et thermique analysée par la fluorescence chlorophyllienne* (Doctoral dissertation, University of Geneva).30-72.
- **Pachauri, R., & Reisinger, A.** (2007). GIEC 2007: Bilan 2007 des changements climatiques. *Contribution des Groupes de travail I, II et III au quatrième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, GIEC.*
- **Parry, M. L.** (Ed.). (2007). *Climate Change 2007: impacts, adaptation and vulnerability: contribution of Working Group II to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Vol. 4). Cambridge University Press.
- **Parwata, I., Indradewa, D., Yudono, P., Kertonegoro, B. D., and Kusmarwiyah, R.** (2012). Physiological responses of *Jatropha* to drought stress in Coastal Sandy Land condition. *Makara J Sci*, 16(2), 115-121.



## Références bibliographiques

- **Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- **Plan Bleu.** (2008). Changement climatique et énergie en méditerranée. *Sophia Antipolis*.
- **Plessis, A.** Analysis of *Arabidopsis thaliana* mutants affected in water deficit tolerance. Thèse Doct.2009.
- **Plomion, C., Costa, P., Dubos, C., Frigerio, J. M., Guehl, J. M., & Queyrens, A.** (1999). Genetical, physiological and molecular response of *Pinus pinaster* to a progressive drought stress. *J. Plant Physiol*, 155, 120-129.
- **Postaire, O., Touraine-Roux, C., Groudin, A., Boursiac, Y., Morillon, R., Schaffner, A.R., & Maurel, A.** (2010). A PIP1 aquaporins contributes to hydrolic pressure-induced water transport in both the root and rosette of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 152(3), 1418-1430.
- **Postaire, O., Verdoucq, L., & Maurel, C.** (2007). Aquaporins in plants: From molecular structure to integrated functions. *Advances in Botanical Research*, 46, 75-136.
- **Puhakainen, T., Hess, MW., Mäkelä, P., Svensson, J., Heino, P., & Palva, ET.** (2004). Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 54, 743–753.
- **Qian, G., Liu, Y., Ao, D., Yang, F., & Yu, M.** (2008). Differential expression of dehydrin genes in hull-less barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) depending on duration of dehydration stress. *Canadian Journal of Plant Science*, 88(5), 899-906.
- **Radhouane, L.** (2007). Response of Tunisian autochthonous pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000. *African journal of biotechnology*, 6(9).
- **Ramanjulu, S., & Bartels, D.** (2002). Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, cell & environment*, 25(2), 141-151.
- **Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., and Perrotta, C.** (2006). Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, cell & environment*, 29(12), 2143-2152.
- **Rana, R. M., Rehman, S. U., Ahmed, J., & Bilal, M.** (2013). A comprehensive overview of recent advances in drought stress tolerance research in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian J. Agri. Biol*, 1, 29-37.



## Références bibliographiques

- **Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., & Vivekanandan, M.** (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of plant physiology*, 127(3), 343-352.
- **Reyes, J. L., Campos, F., Wei, H. U. I., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D. T., & Covarrubias, A. A.** (2008). Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, cell & environment*, 31(12), 1781-1790.
- **Reyes, JL., Rodrigo, M-J, Colmenero-Flores, JM., Gil, JV., Garay-Arroyo, A., Campos, F., Salamini, F., Bartels, D., & Covarrubias, AA.** (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects *in vitro*. *Plant Cell Environ.* 28, 709–718.
- **Ricardi, M. M., González, R. M., Zhong, S., Domínguez, P. G., Duffy, T., Turjanski, P. G., and Iusem, N. D.** (2014). Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato ASR1, a drought stress-responsive transcription factor. *BMC plant biology*, 14(1), 29.
- **Richards, R. A., & Passioura, J. B.** (1989). A breeding program to reduce the diameter of the major xylem vessel in the seminal roots of wheat and its effect on grain yield in rain-fed environments. *Crop and Pasture Science*, 40(5), 943-950.
- **Riera, M., Figueras, M., López, C., Goday, A., & Pagès, M.** (2004). Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9879-9884.
- **Rizza, F., Ghashghaie, J., Meyer, S., Matteu, L., Mastrangelo, A. M., & Badeck, F. W.** (2012). Constitutive differences in water use efficiency between two durum wheat cultivars. *Field Crops Research*, 125, 49-60.
- **Rorat, T.** (2006). Plant dehydrins—tissue location, structure and function. *Cellular & molecular biology letters*, 11(4), 536-556.
- **Rorat, T., Grygorowicz, W. J., Irzykowski, W., & Rey, P.** (2004). Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta*, 218(5), 878-885.
- **RoyChoudhury, A., Roy, C., & Sengupta, DN.** (2007). Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous *lea* gene *Rab16A* from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Rep.* 26, 1839–1859.

## Références bibliographiques

- **Saab, I. N., Sharp, R. E., Pritchard, J., & Voetberg, G. S.** (1990). Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiology*, 93(4), 1329-1336.
- **Sakurai, J., Ahamed, A., Murai, M., Maeshima, M., & Uemura, M.** (2008). Tissue and cell-specific localization of rice aquaporins and their water transport activities. *Plant and cell physiology*, 49(1), 30-39.
- **Sanchez-Ballesta, MT., Rodrigo, MJ., Lafuente, MT., Granell, A., & Zacarias, L.** (2004). Dehydrin from Citrus, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1950–1957.
- **Santos, A. B. D., & Mazzafera, P.** (2013). Aquaporins and the control of the water status in coffee plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(2), 79-93.
- **Sarda, X., G. Vansuyt, D. Touch, F. Casse Delabard & T. Lamaze.** 1992. The root signals of stomatal regulation. In drought tolerance of cereals in rural Mediterranean: genetic diversity and breeding. Seminar Montpellier, France. 15-17 December 1992.
- **Sarhan, F., Ouellet, F., & Vazquez-Tello A.** (1997). The wheat WCS120 gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. *Physiol. Plant.* 101, 439-445.
- **Sassi, K., Abid, G., Jemni, L., Dridi-Al Mohandes, B., & Boubaker, M.** (2012). Étude comparative de six variétés de blé dur (*Triticum durum*. Desf.) vis-à-vis du stress hydrique. *Journal of Animal & Plant Science.* 15(2) : 2157-2170.
- **Saugier, B.** (2009). Le fonctionnement de la plante entière : continuum de l'eau et couplage avec d'autres composés. *Comptes rendus de l'Académie d'agriculture de France*, 95(2).
- **Sayar, R., Khemira, H., Kameli, A., & Mosbahi, M.** (2008). Physiological tests as predictive appreciation for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Agronomy research*, 6(1), 79-90.
- **Scott, P.** (2000). Resurrection plants and secrets of eternal leaf. *Annals of Botany*, 85 (2), 159-166.
- **Secenji, M., Lendvai, Á., Hajósne, Z., Dudits, D., & Györgyey, J.** (2005). Experimental system for studying long-term drought stress adaptation of wheat cultivars. *Acta Biol Szeged*, 49, 51-2.

## Références bibliographiques

- **Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J., & Nguyen, H. T.** (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55(407), 2343-2351.
- **Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
- **Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Seki, M.** (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current opinion in plant biology*, 6(5), 410-417.
- **Silva, M. D. A., Jifon, J. L., Da Silva, J. A., & Sharma, V.** (2007). Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(3), 193-201.
- **Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N., & Feller, U.** (2009). Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought. *Plant growth regulation*, 58(1), 107-117.
- **Slama, A., Salem, M. B., & Zid, E.** (2005). Les céréales en Tunisie: production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 16(3), 225-229.
- **Smirnoff, N.** (1995). Antioxidant systems and plant response to the environment. *Environment and plant metabolism: Flexibility and acclimation*, 42.
- **Smith, K., & Bhave, M.** (2008). Response of Plants to Salt and Water Stress and the Roles of Aquaporins. *Plant Stress and Biotechnology*, 90-104.
- **Stevens, T. J., & Arkin, I. T.** (2000). Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes?. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 39(4), 417-420.
- **SUBA AT1G20440.1:** <http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au/>
- **Suga, S., Komatsu, S., & Maeshima, M.** (2002). Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant and cell physiology*, 43(10), 1229-1237.
- **Suprunova, T., Krugman, T., Fahima, T., Chen, G., Shams, I., Korol, A., & Nevo, E.** (2004). Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant, Cell & Environment*, 27(10), 1297-1308.

## Références bibliographiques

- **Svensson, J., Ismail, AM., Palva, ET., & Close, TJ.** Dehydrins. In: Storey KB, Storey JM, editors. Sensing, Signalling and Cell Adaptation. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science; 2002. pp. 155–171.
- **Tahi, H.** (2008). Efficience de l'utilisation de l'eau d'irrigation chez la tomate par la technique PRD (Partial Rootzone drying) et étude des mécanismes physiologiques et biochimiques impliqués (Thèse Doct, Université Cadi Ayyad, Maroc).
- **Takahashi, R., Joshee, N., & Kitagawa, Y.** (1994). Induction of chilling resistance by water stress, and cDNA sequence analysis and expression of water stress-regulated genes in rice. *Plant Mol. Biol.* 26(2), 339–352.
- **Talamè, V., Ozturk, N. Z., Bohnert, H. J., & Tuberosa, R.** (2007). Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 229-240.
- **Tardieu, F., & E., Dreyer.** (1997). Régulation des échanges gazeux par les plantes soumises à la sécheresse. In L'eau dans l'espace rural. Production végétale et qualité de l'eau. INRA-Éditions. Institut National de Recherche Agronomique. pp. 41-59.
- **Tazi, M. R., Berrichi, A., & Haloui, B.** (2003). Effet du polyéthylène glycol sur la germination et la croissance in vitro de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) des Beni-Snassen (Maroc oriental). *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 14(1), 23-27.
- **Temagoult, M.** (2009). Analyse de la variabilité de la réponse au stress hydrique chez des lignées recombinantes de Tournesol (*Helianthus annuus* L.). Mémoire Magist. Univ Mentouri Constantine. pp50.
- **Tolleter, D., Jaquinod, M., Mangavel, C., Passirani, C., Saulnier, P., Manon, S., Teyssier, E., Payet, N., Avelange-Macherel, MH., & Macherel, D.** (2007). Structure and function of a mitochondrial Late Embryogenesis Abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell* 19, 1580-1589.
- **Tommasini, L., Svensson, J. T., Rodriguez, E. M., Wahid, A., Malatrasi, M., Kato, K., ... & Close, T. J.** (2008). Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional & integrative genomics*, 8(4), 387-405.
- **Tompa, P., Bánki, P., Bokor, M., Kamasa, P., Kovács, Lasanda, G., & Tompa K.** (2006). Protein-water and protein-buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured plant dehydrin: NMR intensity and DSC aspects. *Biophys J.* 91, 2243- 2249.

## Références bibliographiques

- **Tunnacliffe, A., & Wise, M. J.** (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94(10), 791-812.
- **Tyerman, S. D., Bohnert, H. J., Maurel, C., Steudle, E., & Smith, J. A. C.** (1999). Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany*, 50(Special Issue), 1055-1071.
- **Tyerman, S. D., Niemietz, C. M., & Bramley, H.** (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 173-194.
- **Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., & Shinozaki, K.** (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *The Plant Cell Online*, 11(9), 1743-1754.
- **Vartanian, N.** (1973). Particularités adaptatives de la Moutarde blanche, *Sinapis alba* L., à la sécheresse. In *Plant Response to Climatic Factors Proceedings of the uppsala Symposium*.
- **Vaseva, I. I., Anders, I., & Feller, U.** (2013). Identification and expression of different dehydrin subclasses involved in the drought response of *Trifolium repens*. *Journal of plant physiology*, 171(3), 213-224.
- **Vaseva, I. I., Grigorova, B. S., Simova-Stoilova, L. P., Demirevska, K. N., & Feller, U.** (2010). Abscisic acid and late embryogenesis abundant protein profile changes in winter wheat under progressive drought stress. *Plant Biology*, 12(5), 698-707.
- **Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Bohnert, H. J., & Pantoja, O.** (2004). Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiology*, 135(4), 2318-2329.
- **Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K.** (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523-539.
- **Villardell, J., Goday, A., Freire, MA., Torrent, M., Martinez, MC., Torne, JM., & Pages, M.** (1990). Gene sequence, developmental expression and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. *Plant Molecular Biology* 14, 423-432.
- **Vinocur, B., & Altman, A.** (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 123-132.

## Références bibliographiques

- **Virlouvet, L.** (2011). *Identification et caractérisation de gènes impliqués dans la variation de caractères quantitatifs affectés par la sécheresse chez le maïs* (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI). 1-14.
- **Volaire, F.** (2003). Seedling survival under drought differs between an annual (*Hordeum vulgare*) and a perennial grass (*Dactylis glomerata*). *New phytologist*, *160*(3), 501-510.
- **Walker, S. J., Worst, T. J., & Vrana, K. E.** (2003). Semiquantitative real-time PCR for analysis of mRNA levels. In *Drugs of Abuse* (pp. 211-227). Humana Press.
- **Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A.** (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, *218*(1), 1-14.
- **Weig, A., Deswarte, C., & Chrispeels, M. J.** (1997). The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiology*, *114*(4), 1347-1357.
- **Wise, M. J., & Tunnacliffe, A.** (2003). POPP the question: what do LEA proteins do?. *Trends in plant science*, *9*(1), 13-17.
- **Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T. J., Yu, X. M., & Griffith, M.** (1999). Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum*, *105*(4), 600-608.
- **Xiong, L., Schumaker, K. S., & Zhu, J. K.** (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell Online*, *14*(suppl 1), S165-S183.
- **Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W. B., Michalowski, C. B., & Bohnert, H. J.** (1995). A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *The Plant Cell Online*, *7*(8), 1129-1142.
- **Yamada, S., Komori, T., Myers, P. N., Kuwata, S., Kubo, T., & Imaseki, H.** (1997). Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant and cell Physiology*, *38*(11), 1226-1231.
- **Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K.** (2007). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *57*, 781-803.
- **Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., & Shinozaki, K.** (1992). Molecular Cloning and Characterization of 9 cDNAs for Genes That Are Responsive to Desiccation

## Références bibliographiques

in *Arabidopsis thaliana*: Sequence Analysis of One cDNA Clone That Encodes a Putative Transmembrane Channel Protein. *Plant and Cell Physiology*, 33(3), 217-224.

- **Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Zhu, Q., & Wang, W.** (2001). Remobilization of carbon reserves in response to water deficit during grain filling of rice. *Field Crops Research*, 71(1), 47-55.
- **Yang, Y., Liu, Q., Wang, G. X., Wang, X. D., & Guo, J. Y.** (2009). Germination, osmotic adjustment, and antioxidant enzyme activities of gibberellin-pretreated *Picea asperata* seeds under water stress. *New forests*, 39(2), 231-243.
- **Ykhlef, N.** (2001). Photosynthèse, activité photochimique et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Thèse de doctorat. Univ. Constantine.
- **Ykhlef, N., & Djekoun, A.** (2000). Adaptation photosynthétique et résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum turgidum* L. var. durum): Analyse de la variabilité génotypique. *Options Mediterr*, 40, 327-330.
- **Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T.** (2000). Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38(2), 171-186.
- **Zaharieva, M., Gaulin, E., Havaux, M., Acevedo, E., & Monneveux, P.** (2001). Drought and Heat Responses in the Wild Wheat Relative Roth. *Crop Science*, 41(4), 1321-1329.
- **Zandi Esfahan, E., & Azarnivand, H.** (2013). Effect of Water Stress on Seed Germination of *Agropyron Elongatum*, *Agropyron Desertourm* & *Secale Montanum*. *Desert*, 17(3), 249-253.
- **Zerrad, W., Maataoui, B. S., Hilali, S., El Antri, S., & Hmyene, A.** (2008). Etude comparative des mecanismes biochimiques de resistance au stress hydrique de deux varietes de ble dur. *Leb. Sci. J*, 9, 27-36.
- **Zhang, L., Ohta, A., Takagi, M., & Imai, R.** (2000). Expression of plant group 2 and group 3 leagenees in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *J. Biochem.* 127, 611-616.
- **Zhang, Y., Wang, Y., Jiang, L., Xu, Y., Wang, Y., Lu, D., & Chen, F.** (2007). Aquaporin JcPIP2 is involved in drought responses in *Jatropha curcas*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(10), 787-794.
- **Zhang, Z.J., & L.SHI.** (2003). Phtosynthesis and growth responses of *Parthenocius quinquefolia*



## Références bibliographiques

- **Zhu, B., Choi, D. W., Fenton, R., & Close, T. J.** (2000). Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. *Molecular and General Genetics MGG*, 264(1-2), 145-153.



*/Annexes*

## Annexes

**Annexe.1.** Tampons d'extraction, séparation et visualisation des protéines.

**- Tampon d'extraction**

50 mM tris-HCL, pH8

10 mM NaCl

1% SDS

5%  $\beta$  Mercaptoéthanol

**- Tampon Tris pH 8.8**

1.5M Tris -HCl

0.4% SDS

Le pH est ajusté à 8,8

**- Tampon Tris pH 6.8**

0.5M Tris

0.4% SDS

Le pH est ajusté à 6,8

**-Gel de séparation**

12% acrylamide/bis-acrylamide (37/1)

0.375M tris-HCl, pH 8,8

0.1% SDS

0.1% persulfate d'ammonium

0.04% TEMED

**-Gel de concentration**

4% polyacrylamide

0.125M Tris-HCl, pH: 6,8

0.1% SDS

0.1% persulfate d'ammonium

0.1% TEMED.

**- Tampon de migration**

## Annexes

1.92M glycine

0.25M Tris-HCl

1% SDS

### - Tampon de charge, TM2X:

20% glycerol

4% SDS

0.125M Tris -HCl

0.04% de bleu de bromophenol

### - Bleu de coomassie:

500g/l Acide trichloroacétique

4.5g/l bleu de coomasie

### Autres tampons

#### - TAE 10X :

400mM Tris-acétate, pH 8,5

20mM EDTANa<sub>2</sub>

#### - TE:

10mM Tris-HCl, pH-8

1mM EDTANa<sub>2</sub>

### Annexe.2. Tampon de dépôt de l'ARN (Méthode Trizol pour l'extraction des ARNs totaux)

50mg de Xylène cyanol FF

50mg de bleu de bromophenol

10ml H<sub>2</sub>O.

## Annexes

**Annexe.3.** Bandes protéiques révélées par 1D SDS-PAGE des protéines thermostables foliaires.

PM <sup>2</sup> (KDa)	Traitements hydriques <sup>1</sup>											
	T <sup>3</sup>		S <sup>4</sup>		S <sup>5</sup>		S <sup>6</sup>		S <sup>7</sup>			
	B	W	B	W	B	W	B	W	B	W		
14.0	+	↓	+	↓	+	↑	+	↑	+	↑	+	↓
14.4	+	↓	+	↓	+	↑	+	↑	+	↑	+	↓
14.7	—	—	+	—	—	—	+	↑	+	↑	+	—
16.7	—	—	+	↑	+	↑	—	—	+	↑	+	↑
17.0	—	—	+	↑	+	↑	—	—	+	↑	+	↑
17.5	—	—	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑
18.8	+	+	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑
20.0	—	—	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑
21.8	—	—	+	↑	+	↑	—	—	+	↑	+	↑
22.4	—	—	—	—	—	—	—	—	+	↑	+	↑
26.0	—	+	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑
27.9	—	—	—	—	+	↑	—	—	+	↑	+	↑
28.6	—	—	—	—	+	↑	—	—	+	↑	+	↑
29.6	—	—	+	↑	+	↑	—	—	+	↑	+	↑
30.0	—	—	+	↑	+	↑	—	—	+	↑	+	↑
33.2	+	↓	+	↓	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑
37.4	+	↓	+	↓	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑
39.2	+	↓	+	↓	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑
40.0	+	↓	+	↓	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑
41.8	—	—	+	↑	+	↑	—	—	+	↑	+	↑
42.0	+	↓	+	↓	+	↑	—	—	—	—	+	↑
44.4	—	—	+	↑	+	↑	—	—	+	↑	+	↑
45.0	—	—	+	↑	+	↑	+	↑	—	—	+	↑
46.7	—	—	+	↑	+	↑	+	↑	—	—	+	↑
47.5	—	—	+	↑	—	—	—	—	—	—	+	↑
48.0	—	—	+	↑	—	—	—	—	—	—	+	↑
53.9	—	—	+	↑	—	—	+	↑	—	—	+	↑
54.2	—	—	—	—	+	↑	+	↑	—	—	+	↑
55.2	—	—	—	—	+	↑	+	↑	—	—	+	↑
59.1	+	↓	+	↓	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑
60.0	+	↓	—	—	+	↑	+	↑	+	↑	+	↑
60.8	+	↓	—	—	+	↑	—	—	+	↑	+	↑
66.0	—	—	+	↑	+	↑	+	↑	—	—	+	↑
68.4	—	—	+	↑	+	↑	+	↑	—	—	+	↑
69.0	—	—	+	↑	+	↑	+	↑	—	—	+	↑
69.7	—	—	+	↑	+	↑	—	—	—	—	+	↑
84.5	—	—	+	↑	—	—	+	↑	—	—	+	↑
85.3	—	—	+	↑	+	↑	+	↑	—	—	+	↑
87.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	↑
97.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	↑
106.0	—	—	—	—	+	↑	—	—	—	—	+	↑
106.8	—	—	—	—	+	↑	—	—	—	—	+	↑

## Annexes

1 : Traitements hydriques imposés. 2: Poids moléculaire des bandes protéiques révélées en kilo Daltons. 3 : Les témoins des variétés Beliouni et Waha. 4 : Stress hydrique par addition de PEG a 10% durant trois jours. 5 : Stress hydrique par addition de PEG a 10% durant cinq jours. 6 : Stress hydrique par addition de PEG a 20% durant trois jours. 7 : Stress hydrique par addition du PEG a 20% durant cinq jours.

Traitements hydriques										
PM (KDa)	T <sup>1</sup>				S <sup>2</sup>				S <sup>3</sup>	
	B17	GGR	DK	Bou	B17	GGR	DK	Bou	B17	GGR
14.0	—	—	+ ↓	—	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑
15.4	—	—	—	—	—	—	+	—	+ ↑	+ ↑
16.7	—	—	+ ↓	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	+ ↑	+ ↑
17.5	—	—	+ ↓	+ ↓	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	—	+ ↑
18.2	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	+ ↑	+ ↑
19.6	—	—	+ ↓	—	—	—	+ ↑	+ ↓	+ ↑	+ ↑
20.0	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	+ ↑	+ ↑
21.8	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	+ ↑	+ ↑
22.4	—	—	—	—	—	—	+ ↑	—	—	—
23.5	—	—	—	—	—	—	+ ↑	—	—	+ ↑
25.3	—	—	+ ↓	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	—	+ ↑
26.0	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	—	+ ↑
28.6	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	—	+ ↑
29.6	—	—	+ ↓	+	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	—	+ ↑
30.0	—	—	+ ↓	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	+ ↑	+ ↑
33.7	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	+ ↑	+ ↑
34.6	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	+ ↑	+ ↑
35.0	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	—	+ ↑
40.0	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	+ ↑	+ ↑
41.8	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	—	—	—	+ ↑
42.0	—	—	+ ↓	+ ↓	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	—	—
44.4	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	+ ↑	+ ↑
45.0	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	+ ↑	+ ↑
46.7	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	—	+ ↑
51.9	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	+ ↑	—
54.2	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	+ ↑	+ ↑
55.2	—	—	—	—	—	+ ↑	—	—	+ ↑	—
56.7	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	—	+ ↑
59.1	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	+ ↑	+ ↑
60.0	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	+ ↑	+ ↑
61.0	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↓	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	+ ↑	+ ↑
68.4	—	—	—	—	—	—	+ ↑	—	—	+ ↑
69.0	—	—	—	—	—	—	+ ↑	—	—	+ ↑
84.5	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓	—	+ ↑
85.3	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	—	+ ↑
101.0	—	—	—	—	+ ↑	+ ↑	+ ↑	—	—	—

1 : Les témoins des variétés Bidi 17, Guemgoum Rkhem, Djeneh Khetaifa, Bousselem. 2 : Stress hydrique par addition de PEG a 10% durant trois jours. 3 : Stress hydrique par addition de PEG a 10% durant cinq jours.

## Annexes

PM (KDa)	Traitements hydriques									
	S <sup>3</sup>		S <sup>4</sup>				S <sup>5</sup>			
	DK	Bou	GGR	B17	Bou	DK	B17	GGR	DK	Bou
14.0	+↑	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15.4	+↑	+↑	—	—	—	—	—	—	—	—
16.7	+↑	+↑	—	+↓	—	—	—	—	—	—
17.5	+↑	+↑	+↓	—	—	+↑	—	+↓	+↓	—
18.2	+↑	+↑	+↓	—	—	+↑	—	—	+↓	—
19.6	+↑	+↑	—	+↓	—	—	—	—	—	—
20.0	+↑	+↑	+↓	—	—	+↑	—	—	—	—
21.8	+↑	+↑	—	—	—	—	—	—	—	—
22.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23.5	+↑	+↑	—	—	—	—	—	—	—	—
25.3	+↑	+↑	+↓	—	—	—	—	—	—	—
26.0	+↑	+↑	+↓	—	—	+↑	—	—	—	—
28.6	+↑	+↑	—	—	—	+↑	—	—	—	—
29.6	+↑	+↑	+↓	—	—	+↑	—	—	—	—
30.0	+↑	+↑	+↓	—	—	—	—	—	—	—
33.7	+↑	+↑	+↓	—	—	+↑	+↓	+↓	+↓	+↓
34.6	+↑	+↑	—	—	—	+↑	—	—	—	—
35.0	+↑	+↑	+↓	+↓	+↓	+↑	+↓	+↓	+↓	+↓
40.0	+↑	+↑	—	+↓	+↓	+↑	—	—	—	—
41.8	+↑	+↑	—	—	—	—	—	+↓	+↓	—
42.0	—	—	+↓	—	—	—	—	—	—	—
44.4	+↑	+↑	—	+↓	+↓	+↑	+↓	+↓	+↓	+↓
45.0	+↑	+↑	—	+↓	+↓	+↑	+↓	+↓	+↓	+↓
46.7	+↑	+↑	—	—	—	+↑	—	—	—	—
51.9	—	—	—	—	—	+↑	—	—	—	—
54.2	+↑	+↑	—	—	—	+↑	—	—	—	—
55.2	+↑	+↑	—	—	—	+↑	—	—	—	—
56.7	+↑	+↑	—	—	—	—	—	—	—	—
59.1	+↑	+↑	+↓	+↓	+↓	+↑	+↓	+↓	+↓	+↓
60.0	+↑	+↑	+↓	+↓	+↓	+↑	+↓	+↓	+↓	+↓
61.0	+↑	+↑	+↓	+↓	+↓	+↑	+↓	+↓	+↓	+↓
66.0	—	—	+↓	+↓	+↓	+↑	—	—	—	—
68.4	+↑	+↑	—	—	—	—	—	—	—	—
69.0	+↑	+↑	—	—	—	—	—	—	—	—
84.5	+↑	+↑	—	—	—	—	—	—	—	—
85.3	+↑	+↑	—	—	—	—	—	—	—	—

3 : Stress hydrique par addition de PEG a 10% durant cinq jours. 4 : Stress hydrique par addition de PEG a 20% durant trois jours. 5 : Stress hydrique par addition du PEG a 20% durant cinq jours.

+↑ : Bande protéique intensément exprimée, +↓ : Bande protéique de moindre intensité, — : expression inchangée ou non détectée.

## Annexes

### Annexe.4. Analyse de variance des paramètres pris après addition de PEG

Tableau.1. Tableau sommaire de l'analyse de variance.

VARIATE	GRAND MEAN	STANDARD DEVIATION	C OF V
	(N= 126)	-----	SD/MEAN
	NO.	BASED ON	%
	OBS.	TOTAL SS RESID SS	
TRE	126	82,50	<b>9,22</b>
TF	126	20,94	<b>2,12</b>
SUC	126	28,73	<b>13,92</b>
SPAD	126	37,92	<b>2,94</b>
MS	126	9,99	<b>1,81</b>

Tableau.2. Carrés moyens de l'analyse de variance de la teneur relative en eau (TRE), du taux de chlorophylle (SPAD index) et de la température foliaire (Tf) des variétés de blé dur testées, à 0MPa et - 1,2MPa et mesuré à trois dates.

Facteurs	Paramètres		
	TRE	SPAD index	Tf
Géotypes (G)	77,920 <sup>**</sup>	25,493 <sup>**</sup>	2,123 <sup>ns</sup>
Traitement hydrique (T)	5006,359 <sup>***</sup>	368,334 <sup>***</sup>	306,135 <sup>***</sup>
Durée (D)	2890,138 <sup>***</sup>	194,241 <sup>***</sup>	154,355 <sup>***</sup>
Interaction (G x T)	75,992 <sup>**</sup>	8,368 <sup>***</sup>	0,268 <sup>ns</sup>
Interaction (G x D)	49,090 <sup>*</sup>	4,448 <sup>**</sup>	0,299 <sup>**</sup>

ns : effet non significatif, \* : effet significatif  $p < 0,05$ , \*\* : effet hautement significatif  $p < 0,01$ , \*\*\* : effet très hautement significatif  $p < 0,001$ .

## Annexes

Tableau.3. Carrés moyens de l'analyse de variance de la matière sèche (MS) et de la teneur en sucre (Suc) des variétés de blé dur testées, à 0MPa et – 1,2MPa et mesuré à trois dates.

Paramètres		
Facteurs	MS	Suc
Génotypes (G)	9,185 <sup>***</sup>	176,917 <sup>***</sup>
Traitement hydrique (T)	172,692 <sup>***</sup>	11954,681 <sup>***</sup>
Durée (D)	98,575 <sup>***</sup>	6366,792 <sup>***</sup>
Interaction (G x T)	1,474 <sup>**</sup>	190,716 <sup>***</sup>
Interaction (G x D)	1,182 <sup>***</sup>	109,109 <sup>***</sup>

ns : effet non significatif, \* : effet significatif  $p < 0,05$ , \*\* : effet hautement significatif  $p < 0,01$ , \*\*\* : effet très hautement significatif  $p < 0,001$ .



<b>Nom et Prénom :</b> HAMPLA Chourouk	<b>Date de soutenance :</b> 25-02-2016
<b>Thème :</b> Caractérisation des gènes de tolérance à la sécheresse chez le blé dur : étude du rôle des déhydrines et des aquaporines	
<b>Nature du diplôme :</b> Doctorat 3eme cycle en Biotechnologie, Biologie et Environnement, option « Biotechnologie et Génomique Végétales »	
<b>Résumé</b>	
<p>La compréhension des mécanismes moléculaires de tolérance à la sécheresse chez les céréales et notamment chez le blé, demeure primordiale afin de pallier aux effets néfastes du stress. Les stratégies adaptatives mises en place induisent des modifications dans les programmes transcriptionnels d'un assortiment de gènes. La présente étude s'est fixée comme objectif, de réaliser une étude comparative du comportement de quelques variétés de blé dur, en réponse à un stress hydrique au niveau physiologique et biochimique et au niveau moléculaire, en se focalisant sur le profil d'expression de deux gènes de réponse au stress. Trois expérimentations ont été réalisées sur des variétés de blé dur Algériennes. Deux d'entre elles en conditions contrôlées en chambre de culture et une en conditions semi-contrôlées sous serre. En conditions contrôlées, le stress hydrique a été imposé par addition de polyéthylène glycol et sous serre par arrêt d'irrigation. Au niveau physiologique et biochimique la caractérisation de la réponse des génotypes a été effectuée en s'appuyant sur divers indices: la capacité de germination, le nombre de racines, les longueurs foliaires et racinaires, le ratio LR /LF, la matière sèche, la teneur relative en eau, la température foliaire, le taux de chlorophylle, la conductance stomatique, le taux d'électrolyte, la teneur en sucres etc. Une électrophorèse en 1D SDS-PAGE des protéines thermostables a également été réalisée. Les études conduites ont fait ressortir des différences significatives entre variétés et entre traitements hydriques pour la plupart des caractères étudiés, exception faite pour : les longueurs foliaires, les longueurs racinaires et la température foliaire (en présence de polyéthylène glycol). Le stress hydrique a induit une diminution de la capacité de germination, du nombre de racines, de la quantité des feuilles en chlorophylle et de la conductance stomatique ayant pour conséquence une diminution de la production en matière sèche. Mais aussi une diminution de la teneur relative en eau, accompagnée d'une augmentation du taux d'électrolytes et des sucres solubles. Les différences observées concernant les bandes protéiques révélées par 1D SDS-PAGE, se traduisent en terme de poids moléculaire et d'intensité. Une analyse du niveau d'expression d'un gène déhydrine (DHN-5) et d'un gène aquaporine (TdPIP2,1) a été réalisée sous différentes conditions de stress hydrique et sur différents tissus chez deux variétés (Waha et Beliouni). L'expression du gène DHN-5 n'a pas été induite chez les plantes contrôles mais uniquement chez les plantes stressées au niveau des racines, des feuilles et des gaines. Tandis que, l'expression du gène TdPIP2,1 a été observée pour les deux lots de plantes mais dans une plus grande mesure chez les plantes stressées au niveau des racines, des feuilles et des gaines. De plus, les niveaux de transcrits des gènes étudiés ont été plus marqués chez Beliouni. Une surexpression de ces gènes semble améliorer la tolérance au déficit hydrique et entraîner des réponses cellulaires appropriées, afin de pallier au dommage causé par le déficit hydrique à travers divers mécanismes. Il existe une connexion solide entre les modifications qui se produisent au niveau physiologique et cellulaire et celles qui se produisent au niveau moléculaire. La mise en évidence, d'une relation entre les gènes de réponse au stress simultanément exprimés, fournit des données d'une grande importance à la mise en œuvre d'approches biotechnologiques plus élaborées.</p>	
<p>Mots clés: Blé dur, stress hydrique, PEG, germination, traits physiologiques, protéines thermostables, déhydrine, aquaporine, expression génique.</p>	
<b>Laboratoire de recherche :</b> Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale- UFM.	
<b>Membre du jury :</b>	
<b>Président:</b>	Pr. A. Djekoun Professeur Université des Frères Mentouri Constantine
<b>Rapporteur:</b>	Pr. N. Ykhlef Professeur Université des Frères Mentouri Constantine
<b>Examineurs:</b>	Pr. M. Boudjeniba Professeur ENS Alger
	Dr. F. Brini Directeur de recherche CBS Tunisie
	Pr. M.A. Hamidechi Professeur Université des Frères Mentouri Constantine
	Dr. A. Benbelkacem Directeur de recherche INRA Constantine