République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique
Université de Médéa
Faculté des Sciences

Polycopié de cours d'Adaptation des plantes aux contraintes de l'environnement

Selon le programme pédagogique officiel du :
Filière : -Agronomie
-Ecologie
Spécialité :-Master Phytopathologie
-Master Ecologie
Niveau : Master 1
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Dr. Fahima NABI
Maître de conférences classe A
Département Sciences de la Nature et de la Vie (SNV)

Validé par le conseil scientifique de la faculté des sciences à .....
Numéro de série: .....

Année universitaire 2022-2023

Ce polycopié a été expertisé par:

1. ..... Abderrezak CHAOUCH, MCA, Université Dr Yahia Fares de Médéa.
2. ..... Houda MOSTEFAOUI, MCA, Université Dr Yahia Fares de Médéa.

Préface

Ce polycopié traite les effets des contraintes de l'environnement sur les plantes et les mécanismes de réponse au différents stress environnementaux.

Les contraintes majeures sont représentés par les stress abiotiques (stress hydrique et stress salin) ainsi que les stress biotiques.

Ce polycopié s'adresse aux étudiants en Mastère I phytopathologie.il s'organise selon le canevas du module adaptation des plantes aux contraintes de l'environnement enseigné à l'université Yahia Fares Médéa.

Il permet au futur master d'acquérirdes connaissances en biologie intégrative (approches physiologique et moléculaire) sur la diversité des mécanismes de réponse des plantes à leur environnement biotique et abiotique.

NABI F.

CHAPITRE 1 : ADAPTATION DES PLANTES AU STRESS HYDRIQUE

1-L'eau dans la plante

En tant qu'organismes sessiles (fixés sur un support), les plantes doivent absorber l'eau à partir de leur environnement proche. Cette fonction est principalement remplie par les racines, qui montrent une capacité remarquable à croître continûment pour explorer le sol.

L'eau se trouve dans la plante naturellement à l'état liquide, mais aussi sous forme de vapeur d'eau dans les chambres sous stomatiques des feuilles. La richesse en eau des plantes est variable selon les espèces, les organes et les milieux de vie. Alors que certains organes des plantes comme les feuilles et les tiges présentent souvent des teneurs très élevées en eau (voisines de 70-90 %), d'autres organes de la plante, comme les grains de pollen et les graines, peuvent passer par des états déshydratés et dormants, et contenir moins de 30 % d'eau. une salade peut contenir 90 à 93% d'eau, le bois fraîchement coupé peut renfermer 30 à 50 % d'eau. Il faut 1 500 litres d'eau pour obtenir 1 Kg de blé, 500 litres d'eau pour 1 Kg de maïs et 4 500 litres d'eau pour 1 Kg de riz.

Ainsi, tout au long de leur cycle de vie, dans des environnements parfois très hostiles, les plantes doivent développer des stratégies très élaborées pour gérer de manière optimale l'eau qui leur est disponible.

Les rôles multiples assurés par l'eau au sein des plantes en font le premier facteur limitant leur fonctionnement. Parmi ces rôles, on peut citer **:**

- l'eau contribue au maintien de la structure de la cellule et en particulier de la structure colloïdale du cytoplasme.

- elle est le siège des réactions métaboliques en intervenant dans les réactions métaboliques comme l'hydrolyse ou la photosynthèse.

- elle permet la turgescence des cellules et par là même des tissus et des organes.

- elle véhicule les nutriments minéraux et les produits du métabolisme.

- par son rejet dans l'atmosphère sous forme de vapeur, elle emprunte à la plante sa chaleur latente de vaporisation. Elle permet à celle-ci de supporter les rayonnements solaires et les divers échauffements climatiques.

1.2. Notion de stress

La plupart des végétalistes utilisent la terminologie de Levitt, qui est fondée sur les définitions et concepts utilisés en physique des matériaux.

Définition « historique » de Levitt : le « stress » provoque le « strain »

Le « stress » représente une force exercée sur une surface et se traduit par une « strain » dont la mesure correspond à la mesure de la déformation du matériau soumis au « stress ». La transposition au monde biologique proposée par Levitt est assez intéressante. Le 'stress' correspond aux variations environnementales susceptibles d'être défavorables, le 'strain' correspond aux modifications physiologiques et biochimiques. Parmi les stratégies possibles pour la plante : éviter le stress, éviter le « strain » ou tolérer le « strain ». Cette façon de décomposer peut permettre de mieux comparer les stratégies de différentes espèces. Par exemple, entre deux espèces de Nouvelle Calédonie tolérantes au Ni, l'une va limiter activement l'absorption racinaire de nickel (éviter le « strain »), et une autre – hyperaccumulatrice – va tolérer l'accumulation de larges quantités de nickel au sein de ses cellules (elle tolère le « strain »).

Une solution alternative aujourd'hui très souvent utilisée dans la littérature anglo-saxonne est de parler de facteurs de stress et de réponses de stress.

Selon Jones *et al.,* (1989), un stress désigne à la fois l'action d'un agent agresseur (Facteur de stress) et les réactions qu'il entraîne dans l'organisme agressé (réponses au stress), une force qui tend à inhiber les systèmes normaux. D'autre part, les stress environnementaux nés de la fluctuation des facteurs abiotiques (sécheresse, salinité, température) affectent les conditions de croissance, le développement et le rendement des plantes.

Phases successives d'un stress

Une plante soumise à un stress passe par plusieurs étapes selon sa réaction en relation avec l'intensification progressive ou la durée du stress (fig. 1).

Lorsque une contrainte (ou un facteur stressant) survient au niveau cellulaire, commence immédiatement **la phase d'alarme**.

La phase d'alarme débute par la déstabilisation d'un certain nombre de structures, en particulier les membranes, et d'un certain nombre de fonctions (processus biochimiques et métabolisme énergétique) requises pour la poursuite normale des activités vitales de la plante. En quelque sorte, le catabolisme l'emporte sur l'anabolisme : c'est **la réaction fondamentale au stress**. Puis apparaît très, rapidement, des processus de réparation et de restauration de l'état initial par la synthèse de molécule de protection, c'est **la réaction de restitution ou de récupération**. Il y a, alors, retour à l'état initial.

Si le facteur de stress continue, voire même s'intensifie, la plante accentue ses processus de protection, s'installe alors la phase suivante où certains nouveaux caractères (par rapport à l'état moyen ou normal) apparaissent : c'est **la phase de résistance**. L'exposition graduelle au stress induit des modifications physiologiques et fait que la plante augmente sa résistance, survit, et se reproduit au cours de la période de stress (**endurcissement**). L'endurcissement est une acclimatation au stress et correspond à une étape de résistance maximale. Si l'intensité du stress reste stable, un haut degré de résistance est développé par la plante, alors s'ensuit un

retour à une situation d'activité normale (**ajustement**), plus ou moins proche de celle de départ.

Si l'état du stress dure très longtemps, ou si l'intensité des facteurs du stress augmente, **l'étape d'épuisement** peut se mettre en place avec apparition de dommages irréversibles dus au facteur lui-même, menant ainsi à l'effondrement des fonctions de la plante. La réponse au stress est donc une interaction entre l'effort de s'adapté et les processus potentiellement létaux dans le protoplasme.

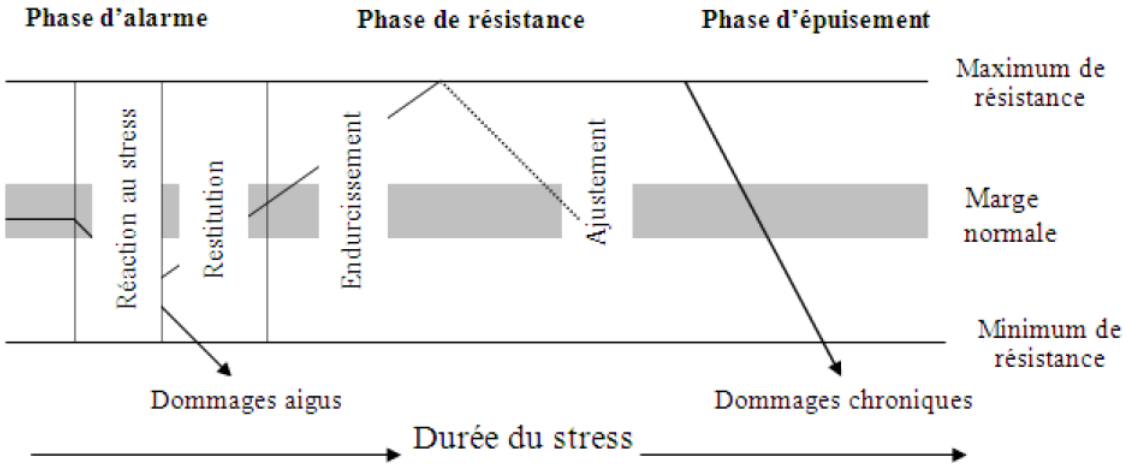


Figure 2 : Les phases successives d'un stress (d'après Selye, 1936, 1973 et Stockers, 1947, *in* Larcher, 1995, modifié).

1.3-Notion de sécheresse

La sècheresse est un problème sérieux dans beaucoup d'environnements arides et semi-arides, où les précipitations changent d'année en année et où les plantes sont soumises à des périodes plus ou moins longues de déficit hydrique. Elle représente un facteur important dans la limitation de la croissance et donc de la productivité végétale**.** Elle affecte plusieurs aspects du métabolisme et de la physiologie de la plante tels que les échanges gazeux, les relations hormonales et surtout le statut hydrique. Dans les zones arides, l'installation d'une sécheresse se manifeste par une restriction de la disponibilité en eau du sol (faibles précipitations) et

augmentation de la demande évaporative (fortes températures). L'adaptation à la sécheresse est sans aucun doute l'un des processus biologiques les plus complexes. Elle implique des modifications morphologiques, biochimiques et génétiques. Pour pallier à cela, il faut recourir à des génotypes tolérants à la sécheresse ou adapter les techniques culturales**.**

1.4. Stress hydrique

Lestresshydriquepeutsedéfinircommelerapportentrelaquantitéd'eaunécessaireàlacroissancedelaplanteetlaquantitéd'eaudisponibledanssonenvironnementsachantquela réserve d'eau utile pour la plante est la quantité d'eau du sol accessible par son systèmeracinaire. Lademandeeneaudelaplanteestquantàelledéterminéeparle niveau de transpiration ou évapotranspiration, ce qui inclut les pertes d'eau tant au niveau des feuilles qu'au niveau du sol.

Il y'a autant de définition du stress hydrique. En effet, on assiste à un stress hydrique lorsque la demande en eau dépasse la quantité disponible pendant une certaine période ou lorsque sa mauvaise qualité en limite l'usage. Le stress hydrique a lieu chaque fois que la vitesse de transpiration de la plante dépasse celle de l'absorption en eau ; autrement dit, lorsque les besoins en eau de la plante ne peuvent être satisfaits par la réserve en eau du sol. Ce dernier se traduit généralement par une réduction de la croissance, mais aussi des échanges gazeux et du métabolisme général de la plante. Il agit différemment en fonction de son intensité et du stade physiologique.

1.5. État hydrique d'une plante et aquaporines

I 'état hydrique d'une plante permet de caractériser son niveau de stress. II peut être défini selon plusieurs méthodes. Parmi les plus importantes, nous retiendrons :

A-Potentiel hydrique foliaire (Ψf)

le **potentiel hydrique foliaire** (Ψf) définit l'état hydrique est essentiellement la résultante des forces d'origine **osmotique** (concentration des solutés) et de **turgescence** (élasticité pariétale)

qui lient l'eau au tissu végétal : $\Psi f = \pi + P$.
Avec π, potentiel osmotique (de signe négatif) et P, potentiel de turgescence (de signe positif). Dans des conditions hydriques normales, la pression osmotique est supérieure à la pression de turgescence, ce qui donne un potentiel hydrique de signe négatif. Un gradient de potentiel de plus en plus négatif s'établit tout au long de la plante, des racines jusqu'aux feuilles, siège des phénomènes transpiratoires.

B- La teneur en eau de la plante

La détermination de la quantité d'eau contenue à un instant donné dans les organes vivants de Ia pIante par rapport au maximum possible peut s'exprimer en turgescence relative (TR) ou ''reIative turgidity'', en déficit de saturation hydrique (DSH) ou ''reIative saturation deficit'' et en teneur en eau reIative (ER) ou ''reIative water content'' (RWC), Ia dernière définition étant Ia pIus utilisée. Elle représente le rapport de la quantité d'eau d'une plante à un moment donné du stress (Es) à la quantité d'eau du même échantillon en état de turgescence maximale (Et).

Cet indice est largement utilisé dans la littérature. Appliqué aux feuilles seulement, il est nommé teneur en eau relative des feuilles (TERF), défini selon l'expression suivante (Turner, 1981)

$$TERF = [(Fw - Dw)/(Tw - Dw)] * 100$$

- TERF (RWC) : teneur en eau reIative des feuilles (%)
- Fw: poids frais de la feuille (g)
- Dw: poids sec de la feuille (g)
- Tw: poids à l'état de turgescence de la feuille (g)

C- Les aquaporines

Découvertes dans le règne végétal, les aquaporines sont des **protéines de transport qu'on trouve dans les membranes des cellules**. C'est un groupe de protéines membranaires hautement conservées appelées MIPs (Major Intrinsic Proteins). Elles forment des canaux qui facilitent le flux, la diffusion et les échanges de l'eau selon un gradient d'osmolarité existant à travers les membranes biologiques. Elles **permettent de faire varier la perméabilité hydraulique de ces membranes** de 1 à 20, orientant de vastes quantités d'eau d'un tissu à l'autre selon des mécanismes de régulation. Elles sont sans aucun doute importantes dans la régulation des flux dans les organes entre les tissus comme dans la croissance volumique des organes par exemple. Pour ce qui est du transport d'eau au sein du *continuum* sol - plante - atmosphère, elles pourraient jouer un rôle particulier dans les **cas de flux faibles** comme la réhydratation nocturne et l'absorption d'eau par de fines racines.

Ces canaux d'eau sont supposés également faciliter le flux de l'eau dans les tissus stressés et permettent un recouvrement rapide de la turgescence après réhydratation. Ceci suppose une fermeture des canaux à eau, empêchant toute perte lors d'un stress.

1.6-Effets du stress hydrique sur la plante

La sécheresse, en tant que stress abiotique, est multidimensionnelle dans sa nature et affecte les plantes à différents niveaux de leur organisation.

1.6.1.Effets du stress hydrique sur la germination

En absence d'humidité suffisante, la graine même si elle est correctement placée dans le sol, elle n'évolue pas, retardant ainsi, la levée de la culture et en cas de persistance de sécheresse la situation peut se traduire par une absence de levée.

La sécheresse est l'un de principaux facteurs environnementaux qui affecte grandement la germination des espèces cultivées et réduit leur survie au cours des stades précoces de développement. Au cours de cette phase, c'est le métabolisme des carbohydrates qui se trouve fortement affecté, à travers la perturbation du fonctionnement enzymatique impliqué dans ce processus. De nombreux gènes contrôlant le métabolisme des sucres simples sont régulés en amont par les variations de l'hydratation cellulaire. Quoi que l'hydrolyse de l'amidon et la libération des sucres réducteurs énergétiques constituent une étape incontournable dans le déroulement de la germination, mais indirectement la disponibilité des carbohydrates pendant cette phase assure un rôle de protection contre le déficit hydrique. Ils constituent les principaux osmolytes impliqués dans l'ajustement osmotique assurent une protection des macromolécules essentiellement membranaires.

1.6.2. Effets du stress hydrique sur la croissance

Chez la majorité des espèces végétales, le stress hydrique est lié à des modifications de l'anatomie et de l'ultrastructure. La diminution de la taille des feuilles, la réduction du nombre de stomates, l'épaississement des parois cellulaires des feuilles, la cutinisation de la surface foliaire, un tissu conducteur mal développé et l'induction d'une sénescence précoce représentent les modifications morphologiques les plus notables.

Sous stress hydrique, l'expansion des cellules ralentit ou cesse et la croissance de la plante est, ainsi, retardée. Le stress hydrique réduit le potentiel hydrique et la turgescence de la cellule végétale. Ceci a pour résultat une diminution de l'agrandissement cellulaire avec pour conséquence une inhibition de la croissance et une l'altération de la reproduction.

le stress hydrique a un effet sur l'agrandissement des cellules plus que sur la division cellulaire. La croissance de la plante en conditions de sécheresse est affectée par l'altération

de la photosynthèse, de la respiration, de l'absorption des ions, du métabolisme carboné et des hormones.

Le rapport racine : partie aérienne augmente sous stress hydrique suite au maintien de la croissance de la racine et de la diminution de celle de la partie aérienne afin de faciliter l'absorption d'eau et de maintenir la pression osmotique d'une part et diminuer les pertes d'eau d'autre part. Un rapport racine:partie aérienne élevé en conditions de stress hydrique est lié à la teneur des racines et de la partie aérienne en ABA et en éthylène et de l'interaction de ces deux hormones.

Le stress hydrique réduit la croissance et de la surface des feuilles. Bien que l'économie de l'eau soit un résultat important de la réduction de la surface foliaire, elle est la cause de la diminution de rendement suite à la diminution de la photosynthèse.

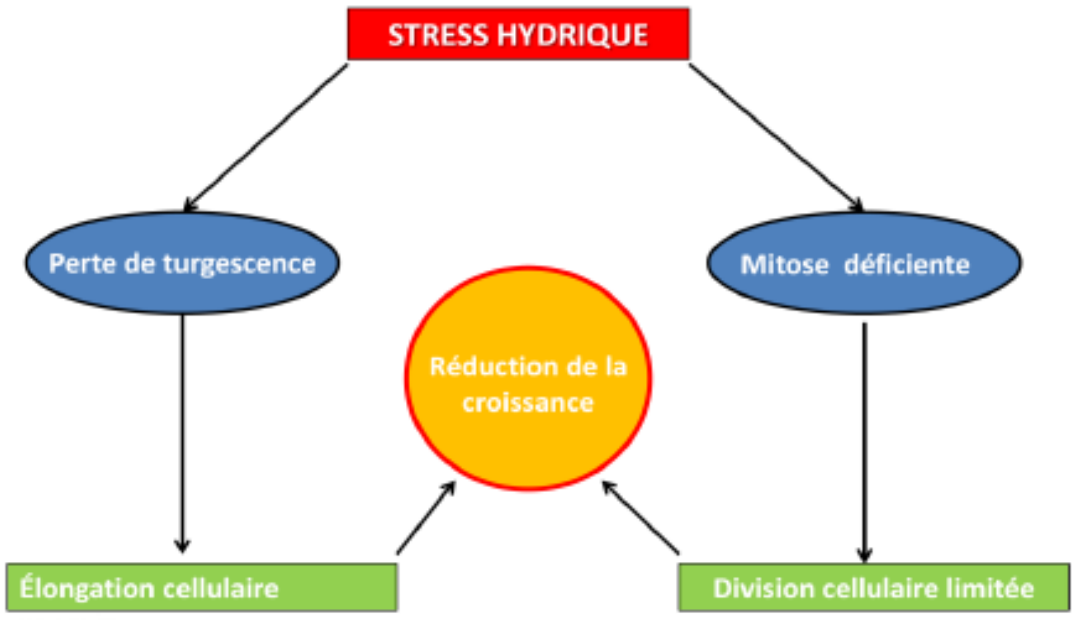


Figure 4: Mécanismes impliqués dans la réduction de la croissance en conditions de stress hydrique.

1.6.3.Effets du stress hydrique sur la photosynthèse

La photosynthèse est particulièrement sensible aux effets du manque d‘eau. La photosynthèse des plantes supérieures décroit avec la diminution de la teneur relative en eau (RWC) et du potentiel hydrique foliaire. Certaines études ont mis en cause la fermeture stomatique dans l‘inhibition de la photosynthèse des plantes en conditions de stress hydrique alors que d‘autres ont conclu que les facteurs non-stomatiques jouent un rôle majeur. En effet, le taux d‘assimilation des feuilles photosynthétiques décroît également suite à des modifications qualitatives et quantitatives dans le pool des pigments photosynthétiques, la réduction de la surface foliaire, l‘altération de la translocation des assimilats, la diminution des métabolites photosynthétiques et des activités enzymatiques et une faible efficacité de carboxylation sous potentiel hydrique bas.

Parmi les autres co-facteurs du stress hydrique, les dommages engendrés à l‘appareil photosynthétique par la production de ROS tels que le superoxyde et les radicaux hydroxyls méritent une attention particulière.

La diminution de la teneur en chlorophylles des feuilles sous stress hydrique est bien connue. Le stress hydrique inhibe la synthèse des chlorophylles au niveau des étapes consécutives de sa biosynthèse. Outre l‘inhibition de la synthèse en conditions de stress, la diminution de la teneur en chlorophylles serait également due aux modifications du ratio lipides : protéines du complexe pigment-protéines ou une augmentation de l‘activité de la chlorophyllase.

La RuBisCO, l‘enzyme clé dans le métabolisme carboné des feuilles, agit en tant que carboxylase dans le cycle de Calvin et en tant qu‘oxygénase dans la photorespiration qui, cependant, est considérée comme un processus défavorable.

La RuBisCO représente le facteur le plus critique influençant la physiologie de la plante en conditions de stress hydrique. Sous stress hydrique, une diminution rapide de la quantité de RuBisCO est observée chez la majorité des plantes ce qui conduit à une faible activité de l‘enzyme. Le manque d‘eau réduit l‘approvisionnement en dioxyde de carbone à partir de l‘environnement par suite de la fermeture des stomates. En conséquence, l‘activité photorespiratoire augmente ce qui assure un réapprovisionnement partiel en substrat (CO_2) et le maintien de fonctionnement de la RuBisCO. À la fin, il en résulte une utilisation de l‘excès d‘équivalents réduits dans le chloroplaste ce qui provoque une augmentation des radicaux libres d‘oxygène conduisant, ainsi, à des dommages d‘ordre oxydatif dans le chloroplaste.

Le stress hydrique réduit le potentiel hydrique et la turgescence de la cellule végétale. Ceci a pour résultat une diminution de l‘agrandissement cellulaire avec pour conséquence une inhibition de la croissance et une l‘altération de la reproduction. S‘ensuit une accumulation de l‘ABA et d‘osmolytes compatibles tels que la proline. A ce stade, la surproduction de ROS aggrave les conséquences du stress mais peut être atténuée par l‘augmentation des activités anti-oxydantes.

1.6.4.Le stress oxydatif et les systémes antioxydants chez les plantes

Les stress environnementaux nés de la fluctuation des facteurs abioiques (sécheresse, salinité, basses température) affectent les conditions de croissance et le rendement végétal..

Chez les végétaux, les processus aérobiques tels que la respiration et la photosynthèse conduisent à la production continue des Espèces Réactives de l’Oxygène (ERO) ou (Reactive

Oxygen Species (ROS)) principalement au niveau des mitochondries, des chloroplastes et des peroxysomes.

Chez les plantes supérieures, le stress abiotique (et biotique) mène invariablement à un stress oxydatif, conséquence d'un fort transfert d'électrons vers l'oxygène au cours des activités photosynthétiques respiratoires et photorespiratoires, genérant une production accrue de ROS. Quand les ROS ne sont pas correctement éliminés, il se produit souvent un stress oxydatif, caractérisé par des réactions délétères entre les ROS et des macromolécules importantes, comme les protéines, les lipides et l'ADN, qui peuvent provoquer des lésions cellulaires

La sécheresse crée un déséquilibre entre la lumière captée et son utilisation et, donc, entre la génération et l'utilisation des électrons, ce qui inhibe la photosynthèse. La dissipation de l'excès d'énergie lumineuse au niveau de l'appareil photosynthétique aboutit à la formation de ROS. Le stress oxydatif est la conséquence de la formation excessive de ROS tels que l'**anion superoxyde (O_2^-), l'oxygène singulet ($^1O_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl (OH^-, espèce la plus réactive).**

La **dénaturation des protéines fonctionnelles** et structurales est la mieux connue des conséquences de la production de ROS dans les cellules). Mais, ces espèces réactives d'oxygène altèrent également l'ADN, les aminoacides, oxydent les pigments photosynthétiques et peroxydent les lipides.

Dans des conditions physiologiques normales ces molécules sont éliminées par les différents complexes **enzymatiques et non-enzymatiques du système de défense anti-agents oxydants.** Cependant, l'équilibre entre la production et l'élimination de ces ROS peut être

perturbé par des facteurs environnementaux pouvant être biotiques : imposés par d'autres organismes, ou abiotiques : résultant d'une altération de l'environnement physique ou chimique. Une irradiance importante, des basses ou des hautes températures auraient pour conséquence d'augmenter rapidement la concentration intracellulaire de ces composés et de dépasser les capacités de détoxification des cellules.

Les systèmes antioxydants consistent en des composés qui inhibent ou retardent l'oxydation d'autresmolécules. Les sytèmes antioxydant incluent :

Les systémes antioxydants enzymatiques :

- La superoxyde dismutase (SOD)
- **Les glutathion péroxydases (GPX)**
- **Ascorbate Peroxydase (ASX)**

Les systèmes antioxydants non enzymatiques :

Anthocyanes, flavones, carotenoides, tocopherol, quinone, phénols.

1.6.5. Action sur la fermeture des stomates

La fermeture des stomates représente la première réponse des plantes à un déficit hydrique. La fermeture des stomates est liée aussi bien à la teneur en eau du sol qu'au statut hydrique de la feuille et est contrôlée principalement par des signaux chimiques tels que l'ABA produit par les racines déshydratées. Une corrélation directe entre la teneur en ABA du xylème et la conductance des stomates a été mise en évidence.

Cette fermeture des stomates implique l'accumulation de l'acide abscissique

L'ABA est importé vers les feuille a partir des racines en cas de stress. L'assèchement du sol déclenche un signal impliquant la synthèse et l'accumulation de l'ABA dans les racines.

L'ABA d'origine foliaire augmente la concentration de Ca^{2+} libre cytosolique par l'entrée du Ca^{2+} à travers la membrane plasmique via les canaux à Ca $^{2+}$, ceci réduit encore plus l'entrée de K+, ainsi la turgescence des cellules stomatiques diminue entrainant la fermeture des stomates.

1.6.6. Effet sur la balance hormonale

Le stress hydrique induit l'accumulation dans les feuilles de l'ABA, lequel est transporté à partir des racines.

L'éthylène (CH2=CH2) a un rôle déterminant lors d'une réponse à un stress (agressions diverses, blessures,..) ; En réponse aux stress hydrique l'ABA, l'éthylène amènent la transcription de divers molécules d'adaptation dont les protéines de choc thermiques (HSP), les osmorégulateurs (proline, bétaine, glycine et polyols)

Le stress hydrique induit une diminution des cytockinines (hormones qui induisent l'ouverture des stomates).

1.6.7. Accumulation des solutés compatibles : Osmoajustement et osmoprotection

L'ajustement osmotique est un mécanisme effectif de résistance à la sécheresse dans une stratégie de bas potentiel hydrique de la plante. Il assure le maintien de la turgescence par accumulation de solutés. L'ajustement osmotique joue directement ou indirectement sur l'ensemble de l'activité de la production de la plante. Les osmolytes intervenants sont très variés dont les sucres et les acides aminés.

Les solutés compatibles sont divisés en trois groupes principaux:
(1) Les acides aminés, les polyamines et les amines quaternaires (glycine bétaïne, dimethylsulfoniopropionate),
(2) Les polyols (mannitol, trehalose)(3) Les sucres tels que le sucrose et les polysaccharides.

Les osmolytes sont Localisés principalement dans le cytoplasme, également dans la vacuole, et possèdent des propriétés biochimiques compatibles, même à forte concentration, avec les fonctions métaboliques, Ce sont des molécules très solubles, neutres à pH physiologique .

Les osmolytes jouent un rôle important dans les réponses de la plante au stress hydrique et dans la résistance. L'accumulation de solutés compatibles est responsable de la résistance à différents stress tels que la sécheresse, les fortes températures et la salinité. La fonction premièredessolutés compatibles est d'empêcher la perte d'eau, de maintenir la turgescence cellulaire et legradient d'absorption de l'eau par la plante. L'accumulation de ces métabolites dans les cellules conduit à une augmentation du potentiel osmotique **(ajustement osmotique)** et, a pour résultat une plus grande capacité d'absorption de l'eau par les racines et sa conservation dans les cellules.

La proline et l'un des acides aminés le mieux étudié et qui s'accumule le plus.

En plus de leur rôle dans **l'osmorégulation**, les solutés compatibles montrent d'autres fonctions telles que la **protection des enzymes, des structures et de l'intégrité membranaires,** le **maintien de la conformation des protéines** à des potentiels hydriques bas, **la neutralisation des radicaux oxygène et la stabilisation des structures des macromolécules cellulaires**.

Les osmolytes pourraient empêcher les interactions entre les ions et les composants cellulaires en remplaçant les molécules d'eau de ces composants, offrant, ainsi, une protection contre la déstabilisation induite par la sécheresse.

1.6.8. -effets du stress hydrique sur la synthèse des protéines

Des conditions de sécheresse provoquent des modifications quantitatives et qualitatives des protéines chez les plantes. En général, les teneurs en protéines des feuilles diminuent au

cours d'un déficit hydrique et ce suite à un ralentissement de la synthèse du fait d'une diminution de l'activité de la nitrate reductase ou de son niveau de transcription. Le stress hydrique altère l'expression génétique et, en conséquence, la synthèse de nouvelles protéines et mRNA.

Les HSP (heat shock proteins) et les protéines de type LEA (dont les dehydrines) représentent deux types majeurs de protéines de stress synthétisées en réponse au stress différents stress dont le stress hydrique. La protection des macromolécules, telles que les enzymes, les lipides et les mRNA, contre la déshydratation est un rôle bien connu de ces protéines.

Des études ont permis de classer les protéines identifiées en différentes catégories selon leur fonction. Le premier groupe de protéines intègre une grande famille de protéines qui sont les LEA. Ces polypeptides sont synthétisés à la fin de l'embryogenèse, ce qui confère leur nom, leur nature est hydrophile. Elles sont fortement exprimées dans les tissus des plantes en réponse à des facteurs de stress environnemental.

Les LEA, forment un groupe remarquable de protéines induites par le stress hydrique et qu'on trouve chez toutes les plantes**,** elles n'ont pas de fonctions enzymatiques, mais elles sont très efficaces dans la protection de membrane cellulaire et des protéines par des structures quaternaires**.**

Ramanjulu et Bartels, (2002) ont proposé que ces protéines puissent jouer un rôle en protégeant les structures cytoplasmiques pendant la déshydratation. Ces protéines sont synthétisées et accumulées pendant les périodes du stress hydrique et après stress osmotique dans tous les organes de la plante, elles ne contiennent ni de Cys (Cystéine) ni de Trp (Trepcine) et de ce fait elles résistent à la dénaturation thermique et à la dénaturation acide, elles pourraient agir comme un tampon pour limiter la sortie d'eau de la cellule**.** Elles ont un poids moléculaire moyen qui varie entre 15 et 200 KDa**.**

Un autre mode d'action a été proposé pour les LEA. En effet, lorsque les plantes subissent un stress violent, les composés cellulaires ont tendance à se cristalliser provoquant de nombreux dommages au sein de la cellule. Ce phénomène peut être contrecarré par les LEA, qui peuvent agir comme des solutés compatibles pour augmenter la viscosité du milieu intracellulaire et ainsi éviter sa cristallisation**.**

Les fonctions et les rôles physiologiques exacts ne sont pas encore bien connus.

Les HSP agissent en tant que molécules chaperonnes et sont responsables de la synthèse, de l'adressage, de la maturation et de la dégradation des protéines dans plusieurs processus cellulaires. Elles jouent également un rôle important dans la stabilisation des protéines et des membranes et dans le repliement des protéines sous conditions de stress hydrique.

1.7. Mécanisme d'adaptation des plantes au stress hydrique

Pour lutter contre le manque d'eau, les plantes développent plusieurs stratégies adaptatives qui varient en fonction de l'espèce et des conditions du milieu. La résistance d'une plante à une contrainte hydrique peut être définie, du point de vue physiologique par sa capacité à survivre et à s'accroître et, du point de vue agronomique, par l'obtention d'un rendement plus élevé que celui des plantes sensibles.

La résistance à la sécheresse est liée à la capacité d'une variété à développer un nombre élevé de mécanismes d'adaptation et non pas à la présence d'un mécanisme donné. elle est la résultante de nombreuses modifications phénologiques morphologiques physiologiques et biochimiques, reflétant différents types d'adaptation (esquive évitement, et tolérance).

La résistance à la sécheresse est un terme générique qui comprend plusieurs processus. On en distingue classiquement quatre: L'échappement, la restauration, la tolérance à la déshydratation et l'évitement. Jones (1992) in (Kiani, 2007), a défini et établi une

classification des ‘stratégies’ d’adaptation des plantes à la sécheresse : la première consiste à "éviter" le stress hydrique et l’autre à le "tolérer".

Les mécanismes d’évitement réduisent l’impact d’un stress bien qu’il soit présent dans l’environnement. La première façon d’éviter la sécheresse est l’esquive. L’esquive permet à la plante de réduire ou d’annuler les effets de la contrainte hydrique par une bonne adaptation de son cycle de culture à la longueur de la saison des pluies. Le développement rapide avec une floraison précoce permet à la plante d’éviter les périodes sèches. Cette stratégie appliquée aux espèces cultivées a amené à décaler la date de semis et/ou à sélectionner des variétés plus précoces permettant d’éviter les déficits hydriques de fin de cycle.

La deuxième façon d’éviter la sécheresse est la capacité de la plante à maintenir un état hydrique satisfaisant. La stratégie de l’évitement est principalement liée, d’une part, à la réduction de la transpiration et d’autre part, à une optimisation de l’absorption d’eau par les racines. Une réduction de la croissance foliaire est bénéfique aux plantes soumises à un stress hydrique, puisque la surface des feuilles est diminuée et la transpiration réduite. Habituellement, l’effet exercé par un potentiel hydrique faible est attribué à une perte de turgescence des cellules des zones en croissance (Nabors, 2008). Du fait que le grandissement cellulaire intervenait suite à une entrée d’eau qui après la relaxation du stress de la paroi cellulaire, provoquait la pleine turgescence des cellules, donc un apport réduit de l’eau se traduit par la réduction de la croissance (Hopkinsw, 2003).

En plus, la réduction de la perte en eau par la fermeture stomatique est un moyen d’adaptation des plantes au stress hydrique. L'efficacité de l'extraction de l'eau du sol par les racines figure parmi les types d'adaptation permettant à la plante d'éviter ou, plus exactement, de retarder la déshydratation de ses tissus (Turner et al., 2001). L’augmentation de l’absorption peut être

due à l'extension de l'absorption en profondeur et en surface, à la vitesse de croissance et de ramification des racines (Laurent et Sané, 2007).

La tolérance exige que l'organisme soit en équilibre thermodynamique avec le stress, ce qui signifie que les conditions qui règnent dans la plante sont en équilibre avec les conditions de l'environnement externe. La tolérance à la sécheresse implique que l'organisme survive à une dessiccation qui n'endommage pas sont protoplasme et qu'il conserve la capacité de reprendre une croissance normale lorsque le protoplasme sera réhydraté. (Temagoult. 2009).

Le maintien de la turgescence lors d'un déficit hydrique permet de retarder la fermeture des stomates, de maintenir le volume chloroplastique et de réduire le flétrissement foliaire. Cette aptitude confère à la plante une meilleure tolérance au déficit hydrique interne qui permet un fonctionnement prolongé de la photosynthèse.

Les produits carbonés peuvent alors être utilisés autant pour l'ajustement osmotique que la croissance racinaire .La tolérance à la sécheresse est le résultat de mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires complexes. L'expression de différents gènes et l'accumulation de divers osmolytes tels que la proline, les sucres solubles (l'ajustement osmotique) couplés à un système antioxydant efficace sont souvent les principaux mécanismes de tolérance au déficit hydrique. Plusieurs de ces mécanismes ont été caractérisés chez différents plantes.

CHAPITRE 2 : ADAPTATION DES PLANTES AU STRESS SALIN

La salinité des eaux et des sols constitue une limitation sérieuse de la croissance et du rendement des cultures dans le monde. Les risques de salinité sont plus importants dans les zones arides et semi-arides caractérisées par une faible pluviométrie, une forte évapotranspiration et une eau d'irrigation fortement minéralisée. 20% des terres irriguées et 50% des terres cultivées dans le monde sont affectées par la salinisation secondaire. Les mêmes auteurs estiment que la moitié des terres irriguées est menacée de salinisation.

En Algérie la salinisation secondaire suite à l'irrigation avec des eaux minéralisées a entraîné une extension de la salure dans de nombreux périmètres irrigués notamment en milieu saharien.

Face à ce problème, plusieurs solutions ont été avancées pour le développement des cultures : i) Dessalement des eaux d'irrigation ou des sols salés, ii) Utilisation de pratiques culturales appropriée et iii) Sélection d'espèces et variétés adaptées à la salinité. Les deux premières solutions apparaissent onéreuses et difficiles à réaliser, en revanche, c'est la troisième qui semble être la plus prometteuse.

2.1-Définitions des sols et eaux salins

Les sols salins sont caractérisés par une conductivité électrique élevée (> 4 dS m^{-1}), une faible activité des ions nutritifs, des rapports élevés de Na^+/Ca^{++}, Na^+/K^+, Ca^{2+}/Mg^{2+}, et Cl^-/NO_3^{-2} dans la solution du sol. Les ions Na^+ et Cl^- sont considérés comme les plus nocifs. Les sols ou les eaux d'irrigation affectée par la salinité, sont ceux qui contiennent

suffisamment de sels solubles susceptibles de compromettre la croissance des plantes. Mais cet effet est évalué différemment selon les pays.

Le NaCl est considéré comme le plus important parce que les ions Na^+ et Cl^- sont nocifs pour les plantes quand ils sont accumulés à fortes concentrations. De plus, les concentrations élevées de Na^+ dans la solution du sol entraîne une détérioration de la structure du sol, ce qui exacerbe l'effet de la salinité en empêchant le drainage ainsi que la disponibilité en eau dans le sol.

La salinité réduit les rendements des cultures dans de nombreuses régions arides et semi-arides du monde où la pluviométrie est insuffisante pour un lessivage des sels dans la zone racinaire.

La salinité du sol existait bien avant les activités humaines et l'agriculture, mais ce sont les pratiques agricoles telles que l'irrigation qui l'ont aggravée. Le stress salin est l'une des contraintes majeures qui limite la croissance et le rendement des cultures. Ayers et Westcot (1985) définissent les sols ou les eaux d'irrigation affectés par la salinité, comme étant ceux qui contiennent suffisamment de sels solubles susceptibles de compromettre la croissance des plantes.

Selon DAOUD et HALITIM (1994), l'évaluation des eaux d'irrigation varie en fonction des pays (Tableau I).

Tableau I - Evaluation des eaux d'irrigation.

Conductivité électrique	Concentration (g/l)	Evaluation		
		Américaine	**Russe**	**De Durand pour l'Algérie.**
CE < 0.25	< 0.2	Faiblement salé	Bonne qualité	Non saline
0.25 < CE < 0.75	0.2-0.5	Moyennement salée	-	Salinité moyenne
0.75 < CE < 2.25	0.5-1.5	Fortement salées	Risque de salinisation	Forte salinité
2.25 < CE < 5	1.5-3	Très fortement salées	-	Très forte salinité
5 < CE < 20	3-7	Salinité excessive	Ne peut être utilisée sans lessivage	Salinité excessive

Source : DAOUD et HALITIM (1994).

2.2. La salinisation des sols

La salinisation est un processus d'enrichissement du sol en sels solubles qui aboutit à la formation d'un sol salin**.**

Le fort éclairement et les rares pluies dans les régions semi-arides et arides accentuent la salinisation des périmètres irrigués et les rendent impropres aux cultures, ainsi l'état de la ressource eau est un élément majeur pouvant influer sur la salinité**.**

D’après **Cherbuy (1991)**, la salinisation d’un milieu implique la présence d’une source de sels qui peut être naturelle, dénommée primaire, et une salinisation anthropique, généralement liée à l’irrigation, que l’on appellera secondaire.

2. 2.1. Salinisation primaire

La salinisation d’un milieu implique la présence d’une source de sels qui peut être naturelle, dénommée la salinité primaire**.** Selon les mêmes auteurs**,** les sels solubles, principalement le chlorure de sodium, peuvent provenir de l’altération des roches contenant des minéraux sodiques potassiques et magnésiques**.**

L’origine des sels peut se trouver dans les matériaux salés plus ou moins récents, qui peuvent être eux-mêmes des roches mères des sols et fournir leurs sels aux oueds qui les transportent jusqu’aux nappes superficielles plus ou moins profondes sous les sols des vallées.

La salinisation primaire, d’origine géologique, marine ou lagunaire correspond à une salinisation liée au fonctionnement naturel des terrains, sous l’influence du climat, de l’altération des roches et de la dynamique des eaux telle que :

- Intrusion de l’eau salée ou submersion des terres basses dans les régions côtières.
- Inondation périodique par de l’eau de mauvaise qualité.
- Remontée d’une nappe phréatique salée près de la zone racinaire.

2.2.2. Salinisation secondaire

La salinisation secondaire est le résultat des activités agricoles qui modifient l’équilibre hydrologique du sol, entre l'eau appliquée (irrigation ou pluie) et l'eau utilisée par les cultures (transpiration). Elle est corollaire à l’irrigation, à la fois conséquence de la quantité d’eau apportée, de sa qualité (nature et concentration des sels) de la texture des sols et du climat, et dans les aires de grande irrigation, s’ajoute l’inadéquation du réseau de drainage des eaux usées.

Les principales causes de la salinisation secondaire sont : a) L'utilisation des cultures annuelles à la place des cultures pérennes ; b) L'extension de l'agriculture en irriguée, le drainage insuffisant, et l'utilisation intense des ressources en eau minéralisées dans un pays soumis à un climat chaud et sec, entraînent inévitablement l'apparition du problème de salinité des sols et des eaux.La salinisation des sols affecte plus de 831 millions d'hectares de terres à l'échelle mondiale (FAO, 2005)**.**

La salinisation secondaire est induite par l'activité humaine qui est liée à des pratiques agricolesinappropriées, par exemple avec de l'eau d'irrigation riche en sel et/ou par un drainage insuffisant**.** Elle peut être induite par des apports anthropiquesdirects des sels utilisés comme fertilisants (KCI, $(NH4)_{2,}$ SO4).

Un climat sec crée une demande évaporatoire élevée qui se traduit par la nécessité d'apport de grandes quantités d'eau pour l'irrigation des cultures. La pratique de l'irrigation dans ces régions représente l'une des plus importantes causes de la salinisation secondaire**.**

3. Principaux sels solubles

D'après **Aubert (1975)**, les principaux sels solubles qui participent dans la formation des sols salés sont :

- **Les carbonates :** Les plus rencontrés sont : le carbonate de sodium (Na2CO3), bicarbonate de sodium (Na HCO3), carbonate de calcium (CaCO3) et le carbonate de magnésium (MgCO3).
- **Les sulfates :** Ce sont les sels de l'acide sulfurique et les plus fréquents sont : le sulfate de magnésium (MgSO4), sulfate de sodium (NaSO4) et le sulfate de calcium (Ca SO4).

- **Les chlorures** : Ils ont une solubilité très élevée et donc une forte toxicité : le chlorure de sodium (NaCl), le chlorure de calcium (Ca Cl2) et chlorure de magnésium (MgCl2) sont plus solubles et fortement toxiques.

2.3- Effets de la salinité sur les plantes

Les sels provoquent chez les plantes des effets ioniques, osmotiques et nutritionnels.

L'effet initial de la salinité, particulièrement à faible ou à moyenne concentrations, est du à ses **effets osmotiques.**

L'effet osmotique est le résultat de la réduction du potentiel hydrique du sol suite à une augmentation du potentiel osmotique dans la zone racinaire. Une forme de sécheresse physiologique survient lorsque l'ajustement osmotique n'est pas suffisant, ce qui rend de plus en plus difficile l'acquisition d'eau et de nutriments par les plantes et le maintien de la turgescence. L'altération de l'état hydrique conduit à la réduction de la croissance et la limitation de la productivité des plantes.

En dépit d'un ajustement osmotique correct, la toxicité ionique survient lorsque l'accumulation des ions, particulièrement Na^+ et Cl^- dans le cytoplasme perturbe l'activité métabolique.

Les effets nutritionnels surviennent lorsque l'accumulation des ions Na^+ dans la plante limite l'absorption des cations indispensables tels que K^+ et Ca^{++} et NO_3^-.

la capacité photosynthétique est réduite par de fortes concentrations de sels. L'effet du NaCl sur la photosynthèse s'exerce par une baisse de la teneur en chlorophylle, une diminution de la surface foliaire, du nombre de feuilles, des dimensions des stomates, de la

conductance stomacale et par l'augmentation de la résistance stomatique. Les teneurs en protéines solubles des feuilles se trouvent également réduites.

De telles modifications des structures anatomiques ou des voies métaboliques peuvent permettre de faire face à la diminution de la disponibilité en eau du milieu, qui constitue une des composantes majeures du stress salin.

La réponse générale des plantes à la salinité est la réduction de la croissance. La réduction de la croissance est une capacité adaptative nécessaire à la survie d'une plante exposée à un stress abiotique. rajoutent, que la réponse immédiate au stress salin est la réduction du taux d'expansion de la surface foliaire jusqu'à sa cessation avec l'augmentation des concentrations de sels.

La réduction de la croissance se produit chez toutes les plantes, cependant leur niveau de tolérance et le taux de réduction à des concentrations de sels létales varient largement avec ou entre les différentes espèces végétales, la variété à l'intérieur de l'espèce, le stade de développement à partir duquel la salinité est initiée, la durée d'exposition au stress salin, la concentration en sels, la composition en sels, et les interactions avec l'environnement.

De plus, des corrélations significatives et non significatives entre la tolérance au stade germination, croissance et rendement ont été signalées.

La plupart des cultures sont tolérantes à la salinité durant la germination, sensibles pendant la croissance et deviennent plus tolérantes à la salinité pendant les stades finaux de croissance. Un des effets primaires du stress salin est qu'il retarde la germination et l'apparition de jeunes plantes.

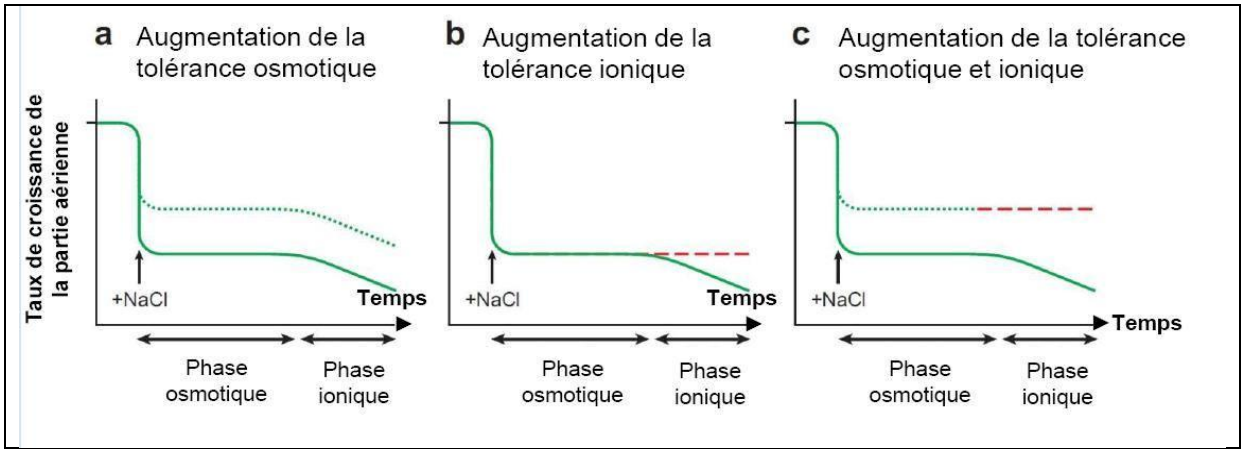


Figure 6 : Illustration schématique hypothétique de la réponse de la croissance aux deux phases de réponse à la salinité pour les génotypes qui diffèrent par la vitesse à laquelle le sel atteint des niveaux toxiques dans les feuilles (Munns et Tester, 2008).

En effet, des expériences visant à tester les effets du stress salin à différents stades de croissance indiquent que le sorgho, le blé et le niébé sont plus sensibles au cours de la phase végétative et au début des stade reproduction, moins sensibles au cours de la floraison, et tolérants au cours de la phase de remplissage des graines.

. En raison des différences dans la tolérance au sel entre les stades de croissance, certains chercheurs ont préféré la sélection pour la tolérance à la salinité en imposant le stress salin durant tout le cycle de croissance. D'autres chercheurs ont exploité avec sucés ces différences de tolérance en substituant l'eau d'irrigation à l'eau saumâtre pendant les stades finaux de croissance des plantes cultivées.

2.4.Effet Du stress salin sur la germination

La germination est définie comme la phase la plus critique du cycle de la plante qui détermine son rendement. Elle est très sensible à la salinité chez plusieurs espèces telles que le piment, l'atriplex et l'origan.

Les données de la littérature rapportent que la salinité affecte la germination des graines en réduisant l'absorption de l'eau durant l'imbibition), suite à la diminution du

potentiel hydrique du milieu. Dans ces conditions, l'hydrolyse des réserves alimentaires stockées dans les tissus et leurs translocations vers l'axe de l'embryon sont limitées.

La salinité peut aussi affecter la germination, en facilitant l'absorption des ions toxiques, qui peuvent causer des perturbations des activités enzymatiques ou hormonales des semences.

L'effet dépressif de la salinité sur la germination est également attribué au stress oxydatif induit par le stress salin .Dans ce cas, les systèmes de protection antioxydants présents dans les graines deviennent inefficaces, ce qui conduit à l'inhibition de la germination. Les niveaux élevés des molécules actives d'oxygène conduisent à la mort cellulaire, en causant des dommages sur les lipides membranaires, les pigments, les enzymes et les acides nucléiques.

La salinité peut retarder ou inhiber la germination des graines. L'augmentation des concentrations de sels réduit le pourcentage de germination et augmente le temps de germination.

Läuchli et Grattan (2007) proposent un schéma général montrant une relation entre le pourcentage de germination et le temps de germination après l'addition des solutions d'irrigation à différents niveaux de salinité (figue 1).

L'augmentation des concentrations salines augmente le temps de germination en retardant le début de germination. Généralement, les faibles concentrations de sel induisent un état de dormance des graines et réduisent la vitesse de germination. Alors que les fortes concentrations de sels inhibent la germination et réduisent le pourcentage de germination.

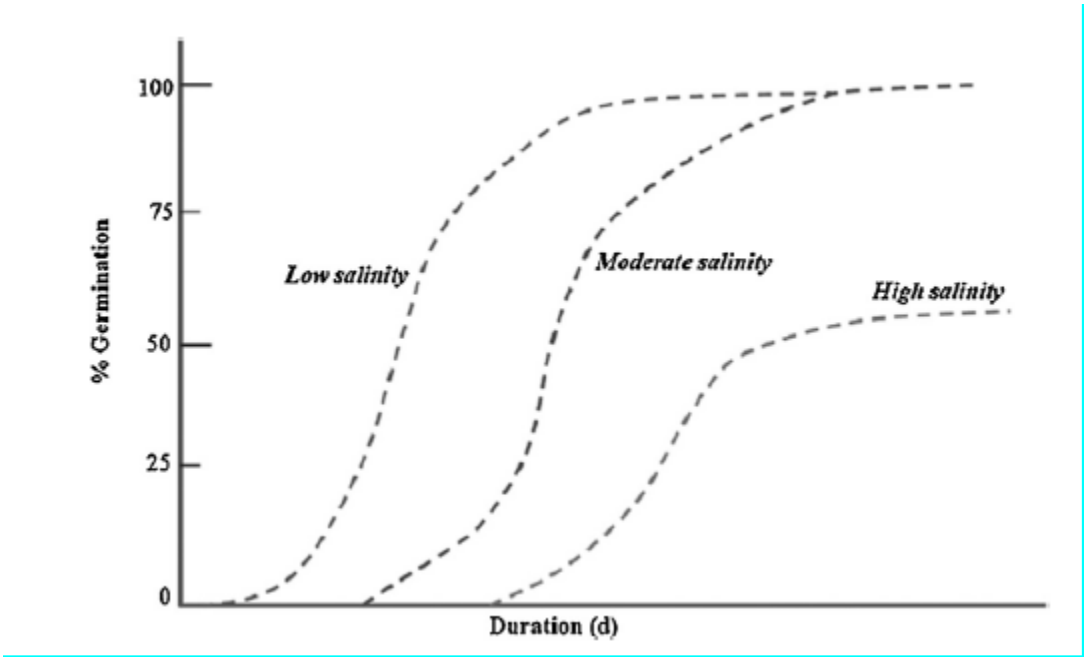


Figure 1. Relation entre le pourcentage de germination et le temps de germination après addition de différents niveaux de salinité (Läuchli et Grattan, 2007).

Les semences des glycophytes et des halophytes répondent de la même manière au stress salin, en réduisant le nombre total des graines germées et en accusant un retard dans l'initiation du processus de la germination. Parmi les causes de l'inhibition de la germination en présence de sel, la variation de l'équilibre hormonal a été évoquée.

La plupart des plantes sont plus sensibles à la salinité durant leurs phases de germination et de levée dont l'effet nocif est de nature osmotique ou bien toxique :

- Les effets osmotiques se traduisent par l'inaptitude des graines à absorber des quantités suffisantes en eau pour les ramener à leur seuil critique d'hydratation, nécessaire au déclenchement du processus de germination.
- Les effets toxiques sont liés à une accumulation cellulaire de sels qui provoquent des perturbations des enzymes impliquées dans la physiologie des graines en germination, empêchent la levée de dormance des embryons et conduisent à une diminution de la capacité de germination**.**

2.5. Effet du stress salin sur la croissance

La réduction de la croissance est l'une des premières réponses à la salinité. La réduction de la croissance est une capacité adaptative nécessaire à la survie d'une plante exposée à un stress abiotique. La réponse immédiate au stress salin est la réduction du taux d'expansion de la surface foliaire jusqu'à sa cessation avec l'augmentation des concentrations de sels.

La réduction de la croissance se produit chez toutes les plantes. Elle varie largement avecles différentes espèces végétales, la variété à l'intérieur de l'espèce, le stade de développement à partir duquel la salinité est initiée, la durée d'exposition au stress salin, la concentration en sels, la composition en sels, et les interactions avec l'environnement. Elle se traduit par une réduction considérable du nombre de feuilles, du poids frais, du poids sec des feuilles, tiges et racines .

L'effet dépressif de la salinité sur la croissance des plantes peut être lié aux déséquilibres de l'état hydrique du sol dû aux effets osmotiques des sels. Une forme de sécheresse physiologique survient lorsque l'ajustement osmotique n'est pas suffisant, ce qui rend de plus en plus difficile l'acquisition d'eau et de nutriments par les plantes et le maintien de la turgescence des feuilles. De ce fait, l'expansion des feuilles est ralentie et par conséquent la surface foliaire photosynthétique est réduite. L'effet du NaCl sur la photosynthèse s'exerce par une baisse de la teneur en chlorophylle, et une diminution de la surface foliaire.

Parmi les autres causes de réduction de la croissance on invoque, les effets toxiques de sels, les déséquilibres ioniques, nutritionnels et hormonaux ou la combinaison de ces facteurs.

Munns et Termaat (1986) ont discuté en détail les processus qui réduisent la croissance des plantes. Ils ont distingué les effets à court terme et à long terme du stress salin. À court terme, la sécheresse physiologique n'est pas la cause de la réduction de la croissance des plantes stressées. C'est plutôt l'énergie nécessaire à la croissance qui devient insuffisante pour assurer la croissance, car cette énergie est dépensée pour accumuler les solutés nécessaires à l'ajustement osmotique.

La réduction de la croissance est due cependant, à la présence de concentrations toxiques du Na^+ ou du Cl^- dans les feuilles des plantes soumises à une contrainte saline sévère. À long terme, les niveaux modérés de salinité, même pour de longues durées, peuvent causer des réductions significatives de la croissance et du rendement de la plupart des cultures sans symptômes de toxicité ou de dommages foliaires.

Le stress salin est le principal facteur limitant la croissance des planteset représente une contrainte majeure qui affecte son développement**.**

Les effets de la salinité sur la croissance des plantes varient en fonction du type de salinité, de la concentration du sel, de l'espèce, de la variété, de l'organe de la plante, ainsi que de son stade végétatif**.**

2.6- Effet sur la photosynthèse

L'effet de la salinité sur la photosynthèse, dépend de la concentration des sels de l'espèce et de la plante ; ce qui est évident qu'une concentration basse de sels peut stimuler la photosynthèse. Un environnement stressant qui affecte la croissance, affecte évidemment la photosynthèse ; de nombreux auteurs montrent que la capacité de la photosynthèse est étouffée par la salinité et cela chez différentes espèces da plantes. Les stress environnementaux qui affectent la croissance, altèrent également la photosynthèse.

En plus de subir un stress osmotique empêchant l'absorption normale de l'eau au niveau des cellules racinaires, la plante doit affronter des désordres dans ses parties **foliaires** :

- La **photosynthèse** est altérée, à cause de la fermeture des **stomates**, phénomène contrôlé par l'hormone acide abscissique, et l'inhibition de la fixation du CO_2 ;
- Le transfert linéaire des électrons au travers du photosystème II est inhibé, le transfert cyclique d'électrons au sein du photosystème I est quant à lui activé ;
- Le mécanisme de **protection** du quenching non photochimique mis en place pour évacuer l'excès d'énergie lumineuse sous forme de fluorescence est exacerbé.

La conséquence immédiate de ces désordres dans la photosynthèse est la production de **formes activées de l'oxygène** (**ROS**, pour *Réactive Oxygène Species*) et l'expression des enzymes impliquées dans la prise en charge du **stress oxydatif** pour empêcher les dommages aux photosystèmes, lipides, protéines et acides nucléiques. Cependant, l'une des ROS, le **peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2), présente également un rôle de signalisation cellulaire dans la tolérance au sel. Ainsi, il y a un mécanisme de **coordination** entre la production de ROS, leur élimination par des enzymes et une quantité suffisante requise pour la signalisation cellulaire

2.7- Effet sur l'anatomie des feuilles

L'excès de sel devient toxique à un certain degré et accélère la sénescence naturelle des feuilles, en réduisant la capacité photosynthétique causée par **la fermeture des stomatesqui limite l'entrée du CO_2**.

La salinité affecte l'ultra structure des chloroplastes l'épaisseur épidermique et mésophyllienne et les espaces intercellulaires ont diminué sensiblement dans les feuilles

de Brugueira parviflora traitées par NaCl. La salinité réduit les espaces intercellulaires chez les feuilles des épinards tandis que chez les plantes de tomate, une **réduction de la densité stomatique** s'est produite.

2.8-Effet sur l'assimilation des éléments minéraux

Une concentration élevée en sels (NaCl) **concurrence l'absorption des autres ions nutritifs**, comme le K^+, le Ca^{2+}, le N et le P ayant pour résultat un désordre alimentaire et éventuellement**, un rendement et une qualité réduits.**

Les effets nutritionnels de la salinité incluent les deux actions primaires du sel sur la plante: la toxicité directe due à l'accumulation excessive des ions dans les tissus et un déséquilibre nutritionnel provoqué par l'excès de certains ions.

Ce déséquilibre nutritionnel est une cause possible des réductions de croissance en présence de sel lorsque des ions essentiels comme K^+, Ca^{2+} ou NO^{3-} deviennent limitants. Des concentrations salines trop fortes dans les milieux provoquent une altération de la nutrition minérale des plantes.

L'accumulation des ions Na^+ dans la plante limite l'absorption des cations indispensables tels que K^+ et Ca^{2+}. Il y aurait une compétition entre Na^+ et Ca^{2+} pour les mêmes sites de fixation apoplasmiques. Ce déséquilibre nutritionnel est une cause possible des réductions de croissance en présence de sel lorsque des ions essentiels comme K^+, Ca^{2+} ou NO^{3-} deviennent limitants. La présence de Cl^- inhibe l'absorption de NO^{3-} . Le chlorure diminue la concentration du phosphore dans les feuilles de blé.

2.9. Effet de la salinité sur la morphologie des plantes :

La salinité affecte toute la plante mais elle freine davantage la croissance des parties aériennes que celle des racines.

2.9.1.1Effet de la salinité sur les racines:

Selon Levigneron *et al*, (1995), les racines sont les premières à réagir. Selon Brun en 1980, l'excès de sel dans l'environnement racinaire donne naissance à des plantes naines. La masse racinaire est moins affectée par la salinité que les limbes, les tiges et les pétioles.

2.9.2. Effet de la salinité sur les tiges :

La longueur des tiges est réduite par l'excès de sel dans le sol. Pour le Tournesol, la réduction de la hauteur de la tige est de 30cm.

2.9.3-Effet de la salinité sur les feuilles :

Des concentrations élevées de sel tel que le Ca++, Mg++ et les bicarbonates provoquent des nécroses sur les feuilles, des décolorations et la réduction de la chlorophylle.

2.10. L'effet de la salinité sur l'absorption

Les sels de la solution du sol peuvent se concentrer à hauteur de 2 à 5 fois leur valeur initiale. Ceci cause une augmentation de la pression osmotique de la solution du sol et rend encore plus difficile pour les racines d'extraire l'eau du sol. C'est ce qu'on appelle une sécheresse physiologique**.**

Les effets osmotiques du stress salin peuvent également limiter la croissance des racines, ce qui limite les possibilités l'absorption des éléments nutritifs du sol.

2.11. Effet de la salinité sur le comportement biochimique de la plante:

Dans des conditions salines, il y a un changement dans le modèle d'expression des gènes et du changement qualitatif et quantitatif dans la protéosynthèse**.** Le stress salin

induit une perturbation de la composition lipidique et protéique au niveau de la membrane cellulaire, affectant ainsi sa stabilité.

Chez diverses espèces, plus ou moins résistantes, on a observé une augmentation des sucres totaux résultant d'un blocage de la glycolyse ou du saccharose provenant d'une forte hydrolyse de l'amidon.

l'accumulation des sucres solubles est importante dans les feuilles des plantes stressées. D'autre part, Aspinall et Paleg (1981) in Aguenral (2001), signalent que la proline est l'acide aminé le plus caractérisé des plantes soumises au stress salin.

L'importance de la proline comme indicateur aux agressions semble jouer un rôle dans le maintien des pressions sol-vacuole, mais aussi dans la protection des membranes et des systèmes enzymatiques. Ainsi qu'un régulateur du pH (Alem et Amri, 2005).Hernandez, (2000) .

Ont constaté que: le génotype tolérant accumule plus de proline que le génotype sensible de Cicer arietinum,à des concentration inferieures à 100mMde Na Cl, la proline aurait aussi un rôle dans la limite de l'osmorégulation.

2.12. Effets du stress salin sur le rendement

Selon MANCHANDA et GARD, la réduction du rendement en grain *Vigna unguiculata*, en présence de la contrainte saline est liée à la réduction de l'approvisionnement des graines en photosynthèse et protéines dû à la diminution de la matière sèche, la taille des 79 tiges et la surface foliaire. Le tout accompagné d'un dessèchement des grains dû au stress hydrique provoqué par les stress salin[107]. La réduction du nombre de gousses et de graines a induit la régression significative du poids de 100 graines et du poids de 100 gousses.

2.13.La classification des végétaux selon leur résistance et/ou tolérance :

Selon Tsope(1939) in Oudina (2014),les plantes halophytes sont divisées en quatre classes :

Les halophytes obligatoires: ce sont des plantes qui exigent les sels

Pendant toute leur cycle de vie.

Les halophytes préférentielles: ce sont des plantes qui exigent les sels pour leur croissance optimale, mais elles existent aussi dans les environnements non salins.

Les halophytes accidentelles: ce sont les plantes qui se trouvent dans les environnements salins par accidents.

Les halophytes résistantes: ce sont des plantes qui peuvent se développer dans les milieux saline

Les glycophytes

Venant du grec=doux s'opposent aux halophytes. Ne peuvent tolérer le stress salin, et sont sévèrement troublés ou même tués par 100 à 200mol/l de Nacl **(**Belkhodja, 2006 In Gaid, 2015

2.14. - Tolérance des plantes à la salinité

La tolérance des plantes à la salinité est l'aptitude des cultures à résister aux effets excessifs des sels au niveau de la rhizosphère ; elle est évaluée par l'aptitude des végétaux à croître et survivre sur des substrats salins.

Les mécanismes génétiques de la tolérance au sel chez les plantes ne sont pas encore totalement compris à cause de leur complexité. Les effets de plusieurs gènes qui contrôlent la tolérance à la salinité des différentes espèces interagissent fortement avec les conditions environnementales .

La réponse la plus appropriée pour évaluer la tolérance au sel est la mesure de la croissance ou du rendement, en particulier à des taux de salinité modérés. La tolérance au sel, en fait, peut être habituellement évaluée par le pourcentage de production de biomasse dans des conditions salines par rapport aux conditions témoins (non salées) sur une période de temps, ou en terme de survie.

La sensibilité à la salinité d'une espèce donnée peut changer pendant l'ontogenèse. Des corrélations significatives et non significatives entre la tolérance au stade germination et croissance sont signalées. La plupart des cultures sont tolérantes à la salinité durant la germination, sensibles pendant la croissance et deviennent plus tolérantes pendant les stades finaux de croissance.

Des expériences visant à tester les effets du stress salin à différents stades de croissance indiquent que le sorgho, le blé et le niébé sont plus sensibles au cours de la phase végétative et au début du stade reproduction, moins sensibles au cours de la floraison, et tolérants au cours de la phase du remplissage des graines (Maas *et al.,* 1986 ; Maas et Poss, 1989).

La germination correspond au stade de développement le plus sensible du cycle de la plante. En effet, Beatty et Ehlig (1973) confirment cette sensibilité durant la germination et signalent une tolérance au cours de la croissance.

Certains chercheurs suggèrent que les différents stades de croissance, tels que la germination, l'émergence, la croissance et le rendement doivent être étudiés séparément lors de l'évaluation du matériel génétique pour la tolérance au sel. De telles évaluations peuvent faciliter le développement des cultivars présentant des caractéristiques de tolérance au sel tout au long de l'ontogenèse de la plante (Foolad et Lin, 1997). Murillo-Amador *et al.* (2001), signalent que la sélection de tous les caractères est souhaitable durant la phase de germination et de roissance précoce.

Les mécanismes de tolérance à la salinité se répartissent en trois catégories : la tolérance au stress osmotique, l'exclusion de Na^+ des limbes des feuilles et la tolérance tissulaire (Munns et Tester, 2008).

2.4.1. Tolérance au stress osmotique

La croissance des plantes stressées est principalement limitée par l'effet osmotique de la salinité.La tolérance osmotique impliquela capacité de la plante à tolérer la sécheresse physiologique due au stress salin et à maintenir l'expansion des feuilles et la conductance stomatique.

James *et al.* (2008), constatent une corrélation positive entre la conductance stomatique et le taux de croissance des plantules stressées par le sel, la conductance stomatique élevée est liée à untaux d'assimilation de CO_2 élevé. Cependant, si les concentrations de sel augmentent, elles deviennent toxiques, entraînant la mort des feuilles anciennes, la réduction de la croissance foliaire des jeunes feuilles et la limitation de la production de nouvelles feuilles à cause de la réduction de l'offre en photosyntétats. Pour cette raison, l'augmentation de la tolérance osmotique implique l'augmentation de l'aptitude des plantes à continuer la croissance et la production de nouvelles et grandes feuilles et à garder une conductance stomatique élevée. L'expansion de la surface foliaire ne peut être assurée que chez les plantes bien irriguées.

2.4.2. Exclusion de Na^+

Ce mécanisme de tolérance implique l'aptitude de la plante à réduire la toxicité ionique en minimisant la quantité de Na^+ qui s'accumule dans le cytosol des cellules, en particulier celles dans les feuilles transpirantes. Ce mécanisme implique une régulation de l'expression de canaux ioniques et des transporteurs spécifiques, permettant le contrôle du transport des ions Na^+ à travers la plante.

À l’échelle de la plante entière, les ions chlorure de sodium entrent par les racines, sont véhiculés par la sève xylémique jusqu’aux tiges et aux feuilles. Là, ils sont très peu retenus et revéhiculés par la sève phloémique jusqu’aux racines (plantes de type *exluder*). L'exclusion de Na^{+} par les racines permet de prévenir son effet toxique, grâce à son accumulation à des concentrations élevées dans les feuilles.

2.4.3. Tolérance des tissus

Le mécanisme de tolérance des tissus, entraîne une augmentation du taux de survie des vielles feuilles. Ce mécanisme nécessite la compartimentation des ions Na^{+}et Cl^{-} au niveau cellulaire et intracellulaire, et la synthèse et l'accumulation de solutés compatibles dans le cytoplasme.Les solutés compatibles jouent un rôle dans l'osmorégulation des plantes de diverses manières, telles que la protection des enzymes de dégradation et la stabilisation des membranes et des protéines.Ils comprennent les composés azotés tels que les acides aminés, les amines et les bétaïnes, mais aussi organiques,tels que les acides, les sucres et les polyols.

Une plante soumise au stress salin doit faire face à la pénétration de sel dans ses tissus. Ce dernier est rejeté ou accumulé par les différents organes, tissus, cellules et compartiments cellulaires. À l’échelle de la plante entière, les ions chlorure de sodium entre par les racines, sont véhiculés par la sève xélymique jusqu’aux tiges et aux feuilles. Là, ils sont soit stockés (plantes de type *includer**) soit au contraire très peu retenus et revéhiculés par la sève phloémique jusqu’aux racines (plantes de type *exluder**).

Ainsi, les plantesutilisentdeux stratégies de résistance pour tolérer les fortes salinités :

- ❖ La résistance par **exclusion** (« *stress avoidance* », les plantes sont de type *exluder*[1] en anglais), souvent réduit au terme de résistance. L'organisme inhibe ou réduit la pénétration des sels dans ses tissus.

- ❖ la résistance par **tolérance/inclusion** (« *stress tolerance* », les plantes de type *includer** en anglais »), souvent réduit au terme de tolérance. Elle est liée à l'association des mécanismes adaptatifs qui permettent la survie des plantes en dépit de l'influence du stress à l'intérieur de l'organisme.
- ❖ La prévention, pour éviter l'accumulation excessive des sels dans les tissus des plantes est réalisée par les mécanismes suivants :

- ✓ Contrôle de l'absorption de sel au niveau des racines et la régulation des ions Na^+ exportés aux tiges par leur accumulation dans le xylème, puis leur récupération du xylème avant d'atteindre les tiges.
- ✓ La sélectivité Na^+/K^+
- ✓ Recirculation des sels par l'intermédiaire du phloème
- ✓ Répartition de sels dans certaines parties des plantes
- ✓ Fuite d'ions et abscission des organes chargés de sels,
- ✓ Contrôle de la transpiration
- ✓ Sécrétion des ions par des structures d'excrétion de sels.

Le mécanisme d'exclusion de sel est caractéristique des glycophytes. Ce mécanisme est utilisé par les légumineuses tropicales. En effet, chez le haricot, les ions s'accumulent dans les parties basales des tiges, d'où ils retournent au système racinaire et sont excrétés de nouveau dans le milieu.

Cependant, l'accumulation élevée des sels au niveau des tiges a été bien établie chez les halophytes. Cette stratégie est liée à l'efficacité de telles plantes à « compartimenter » les ions dans les vacuoles. Dans ce cas, des ions de potassium et des solutés organiques dits compatibles (ex. la proline, la glycine betaine, le mannitol et les sucres solubles) doivent être accumulés dans le cytoplasme afin de réaliser et maintenir un équilibre osmotique et ionique entre les deux compartiments, le cytoplasme et la vacuole.

2.5. Rôle du calcium dans la réponse au stress salin

D'une manière générale, les cellules végétales accumulent les ions potassium et excluent le sodium. Le rapport potassium / sodium élevé résultant dans les cellules permet au potassium d'effectuer ses fonctions essentielles que le sodium ne peut pas accomplir. Selon les mêmes auteurs, cette sélectivité en faveur du potassium est particulièrement importante dans les zones arides et semi arides, où l'excès en sels de sodium dans le sol provoque souvent des problèmes graves pour la production végétale.

La présence du NaCl dans le sol inhibe l'absorption de K^+, Ca^{2+}, P, NO_3^- et NH_4^+. Les teneurs en ces éléments dans les parties aériennes des végétaux diminuent en présence de NaCl. Cette diminution est associée à l'inhibition de l'absorption de ces éléments par le système racinaire. Le sodium entre en compétition avec le potassium pour les sites d'absorption et les fonctions essentielles telles que l'activation des enzymes, ce qui permet de limiter la croissance des plantes.

De plus, la salinité induit la production des formes actives d'oxygène (ROS), parmi l'oxygène singulet ($^1O_2$),le radicalsuperoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^-), suite à l'altération du métabolisme au niveau des mitochondries et chloroplastes (Blumwald *et al.*, 2004). Ces formes actives d'oxygène causent le stress

oxydatif dont les effets néfastes se répercutent sur différents composants cellulaires tels que les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques.

Les plantes éliminent les molécules actives d'oxygène par le système antioxydant non enzymatiques (acide ascorbique, glutathionne et tocophérols) et des systèmes antioxydants enzymatiques (exemple : superoxide dismulatse, la catalase, ascorbate peroxydase …ect).

Dans ces conditions, l'amélioration de l'ajustement osmotique et l'équilibre ionique et du système antioxydant sont nécessaires pour le développement des plantes tolérantes à la salinité. En d'autres termes, le maintien d'une concentration suffisante en K^+ et Ca^{++} et un rapport de sélectivité K^+/Na^+ élevé dans les parties aériennes, et d'un système antioxydant efficace sont nécessaires pour le fonctionnement normal des cellules et organes.

En tant que macroélément essentiel, le calcium joue des rôles importants tels que la stabilisation des membranes et des parois, l'amélioration du processus métabolique des autres nutriments, la régulation du processus enzymatique et hormonal, et l'amélioration du système de défense antioxydant. Le calcium est nécessaire pour permettre un transport suffisant de K^+; il est également important pour la sélectivité du transport ionique.

Le calcium Ca^{2+} peut réguler l'influx de Na^+ dans les racines. L'ajout de Ca^{2+} à la solution externe peut réduire les effets toxiques de Na^+ en raison de l'inhibition de l'influx unidirectionnel de Na^+ par le Ca^{2+}. L'influx de Na^+, sensible au Ca^{2+} se produit au travers des canaux cationiques non sélectifs (NSCCs - *Non Selective Cation Channels*) (Demidchik et Tester, 2002 ; Shabala *et al.,* 2006), des canaux nucléotides cycliques-dépendants (CNGCs) ou des récepteurs au glutamate (GLRs) qui sont bloqués par le Ca^{++} en cas de stress ionique.

En outre, le supplément en calcium peut inhiber l'efflux de K^+ induit par le Na^+ par la dépolarisation des membranes. En effet, Shabala *et al.*(2003) montrent que le supplément

en Ca^{++} à la solution saline (NaCl), permet de limiter ou inhiber totalement l'efflux de H^+, K^+ et $NH4^+$ à travers l'épiderme racinaire, induit par le stress salin chez l'orge.

Les mêmes auteurs confirment après mesure du potentiel membranaire des cellules épidermiques racinaires, que les niveaux élevés du supplément en calcium sont capables de restaurer (ou dépolariser) le potentiel membranaire jusqu'au même niveau que celui du témoin non soumis au stress salin.

Soualem *et al.* (2014) ont étudié l'effet de l'apport de sulfate de calcium ($CaSO_4$) chez deux populations algériennes d'*Atriplex halimus* soumises au stress salin ; les résultats montrent une réduction de la croissance avec l'augmentation de la concentration de NaCl.

La teneur en Na^+ des feuilles augmente avec l'augmentation du stress salin et entraîne une réduction de la croissance des plantes. En réponse à l'intensité du stress salin et à l'apport de calcium ($CaSO_4$), les plantes accumulent plus de sucres solubles, de proline et de K^+, le calcium atténue l'effet négatif de la salinité sur la croissance.

JASIM*et al*. (2016) ont étudié l'efficacité du calcium à différentes concentrations dans l'amélioration de la tolérance à la salinité du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Ils indiquent que le calcium exogène améliore la croissance en hauteur, la surface foliaire, les teneurs en chlorophylle, la teneur relative en eau, les teneurs en proline, l'activité peroxydase, les teneurs en K^+ et le rapport K^+/Na^+.

Ces auteurs constatent que le calcium exogène peut améliorer le système de défense antioxydant des plantes au stress salin, ils suggèrent l'existence d'une corrélation (lien) entre l'enzyme antioxydant (peroxydase) et l'ion calcium impliqué dans la stimulation de la croissance et l'amélioration de la tolérance au sel.

Les événements précoces de l'adaptation des plantes au stress commencent par les mécanismes de perception puis de signalisation, via une transduction de signaux et de

messagers afin d'activer les diverses réponses physiologiques et métaboliques, y compris l'expression de gènes de réponse au stress.

Le calcium joue un rôle en tant que molécule messager secondaire principale dans différents aspects de la croissance et du développement des plantes et la tolérance au stress, y compris la salinité . Dans les cellules, le stress osmotique stimule initialement l'influx de Ca^{2+} et inhibe son efflux.

En outre, les flux de Ca^{2+} induits par le stress osmotique sont liés à l'acide abscissique (ABA). En effet, l'ABA peut induire la libération de Ca^{2+}. Ce dernier peut à la fois activer des récepteurs Ca^{2+} dépendants et jouer un rôle dans la transduction du signal.

Selon Mahajan *et al*.(2008), des augmentations transitoires de Ca^{2+} cytosolique sont perçues par les différentes cascades de phosphorylations : CDPK (Ca^{2+}-*dependent protein kinases*), MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (Rodriguez *et al*., 2010), protéines phosphatases, etc. Ces protéines kinases par la suite induisent l'expression des facteurs de transcriptions tels que : EREBP (*Ethylene-Responsive Element Binding Proteins*), EREBP/AP2 , bZIP (*basic leucine zipper*) et MYB.

Ce sont les éléments clés qui contrôlent et modulent les voies d'adaptation au stress abiotique chez la plante. Les facteurs de transcription à leur tour activent l'expression des gènes de réponse au stress tels que les gènes codant des LEA-like, les antioxydants, la synthèse d'osmolytes, les enzymes, les transporteurs, etc... qui vont conduire à la mise en place des mécanismes de tolérance au stress.

D'après Rahman *et al*. (2016), l'apport supplémentaire de calcium aux plantules de riz stressées par le sel, améliore l'hémostasie ionique par inhibition de l'influx de Na^+ et la fuite des ions K^+ à travers les canaux cationiques non sélectifs (NSCCs - *Non Selective Cation Channels*) et les canaux de potassium (Gork). Selon les mêmes auteurs, le calcium améliore

également la détoxification des molécules actives d'oxygène par le renforcement du système de défense antioxydant.

CHAPITRE 3- TRAITEMENTS PRÉGERMINATIFS DES SEMENCES

La Semence

La semence La graine est une étape importante dans le cycle de vie végétal supérieur en ce qui concerne sa survie en tant qu'espèce. C'est l'unité de dispersion de la plante, qui est capable de survivre à la période entre la maturation de la graine et l'établissement de la prochaine génération en tant que plante après sa germination. Pour cette survie, la graine, principalement à l'état sec, est bien équipée pour supporter de longues périodes de conditions défavorables (Bewley, 1997). Le développement des graines est divisé en trois grandes étapes : l'embryogenèse, le remplissage (l'accumulation des réserves) et la dessiccation (Phase de quiescence) (Bewley and Black, 1994).

III.2. La germination

La production végétale et l'établissement de bonnes cultures agricoles dépendent étroitement de la germination des semences qui est une étape cruciale dans le cycle de vie des végétaux supérieurs (Cheng and Bradford, 1999).

II.2.1. Définition

La germination est définie comme la somme des événements qui conduisent la graine sèche à germer; elle commence par la prise d'eau et se termine par l'allongement de l'axe embryonnaire (HOPKINS, 2003).

La germination est le passage de la vie latente de la graine à la vie active, sous l'effet de facteurs favorables. Selon MAZLIAK (1982), c'est un processus physiologique dont les limites sont le début de l'hydratation de la semence et le tout début de la croissance de la radicule. Une semence a germé, lorsque la radicule a percé les enveloppes ou elle est visiblement allongée (BEWLEY, 1997)

Priming

Plusieurs approches sont utilisées depuis plusieurs années afin de résoudre les problèmes posés par l'hétérogénéité de la germination et améliorer la croissance et le rendement des cultures. La technique la plus fréquente est le traitement prégerminatif des semences, dénommées aussi « amorçage », « endurcissement » ou «priming » en anglais.

L'amorçage améliore la germination des graines, permet la levée de la dormance et la synchronisation de la germination, améliore également l'émergence des plantules et la croissance sous conditions de stress salin et peut augmenter la tolérance des plantes au sel.

C'est une méthode physiologique qui améliore la production végétale en modulant les activités métaboliques de la germination avant l'émergence de la radicule (Rosental *et al*., 2014), c'est-à-dire au cours de la phase réversible de la germination. Pendant cette phase, la semence peut revenir à son état initial tout en gardant sa capacité de germination (Ratikanta, 2011).

Au cours de l'amorçage, les semences sont hydratées partiellement à un niveau d'humidité suffisant pour permettre le déroulement des processus métaboliques prégerminatifs, sans pour autant déclencher la percée de la radicule (Rosental *et al*., 2014**).** Il entraîne la germination partielle des graines en les trempant dans l'eau ou dans une solution de sels pendant une période spécifiée et les déshydrater avant l'émergence de la radicule (Ashraf et Foolad, 2005).

Le succès du priming dépend de plusieurs facteurs, tels que la durée de l'amorçage, la température à laquelle est conduit le traitement, la méthode de prétraitement, la vigueur de la graine, l'espèce ainsi que la concentration de la solution d'amorçage (Maiti et Pramanik, 2013)**.** L'optimisation de la technique d'amorçage est importante afin d'obtenir les meilleurs résultats (Maiti et Pramanik, 2013).

3.1. Processus d'amorçage

L’amorçage des graines est un traitement prégerminatif qui expose les graines à une certaine solution pendant une certaine période, permettant une hydratation partielle, la germination est interrompue juste avant l’émergence de la radicule à travers les téguments.

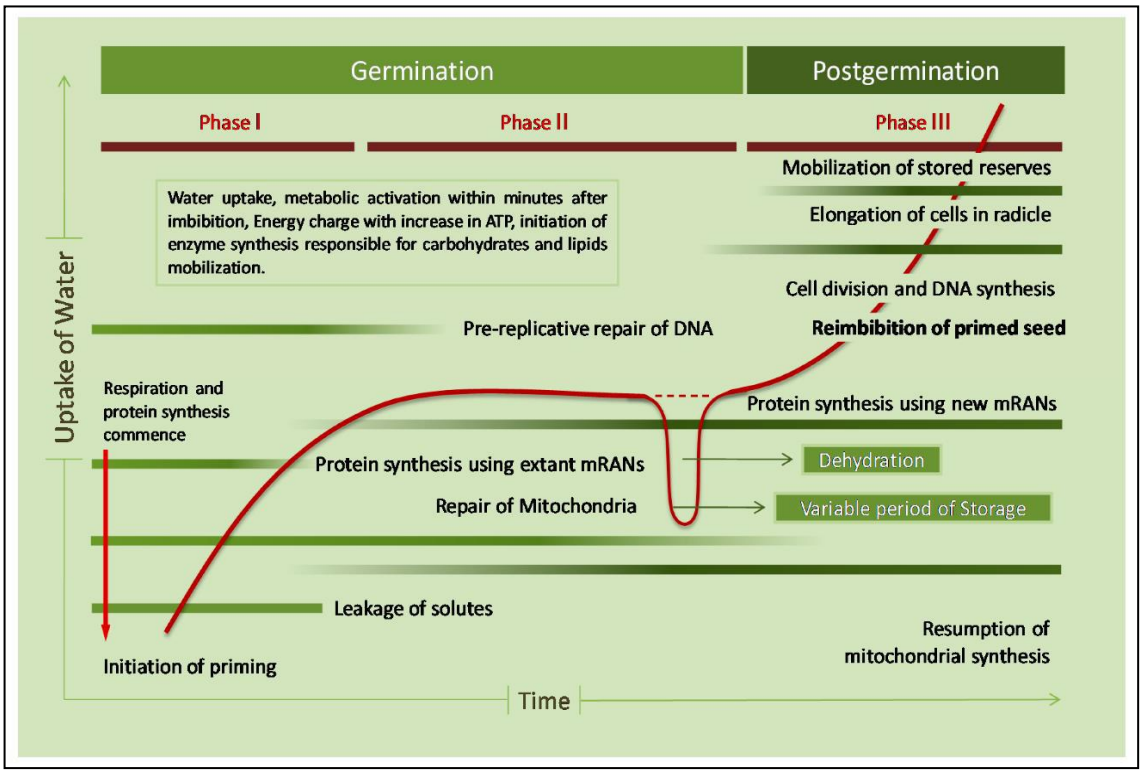


Figure n°06: Les phases successives lors d'un stress (Larcher, 1995, modifié).Schéma physiologique représentant l’implication du priming dans l’accélération des mécanismes métaboliques de la germination des graines (Bewley, 1997, modifiée par Mirmazloum et al., 2020).

Lorsque les graines sont imbibées dans l’eau, le processus de germination des graines non dormantes (figure 2) se déroule en trois phases : 1) L’imbibition, 2) Phase de latence et 3) La percée de la radicule à travers les téguments.

L’hydratation des graines pendant l’amorçage est contrôlée, le niveau d’hydratation est suffisant pour déclencher les processus physiologiques associés à la phase précoce de germination (métabolisme de prégermination), mais empêche la germination complète de la

graine. Ceci empêche les graines de rentrer dans la troisième phase de germination, et les maintiennent dans la phase initiale de germination (activation) (figure 2).

Les graines sont par la suite enlevées de la solution d'amorçage et séchées jusqu'à obtention du niveau initial d'humidité, afin de maintenir l'effet bénéfique de l'amorçage. Le séchage est nécessaire pour permettre le stockage des semences après l'amorçage.

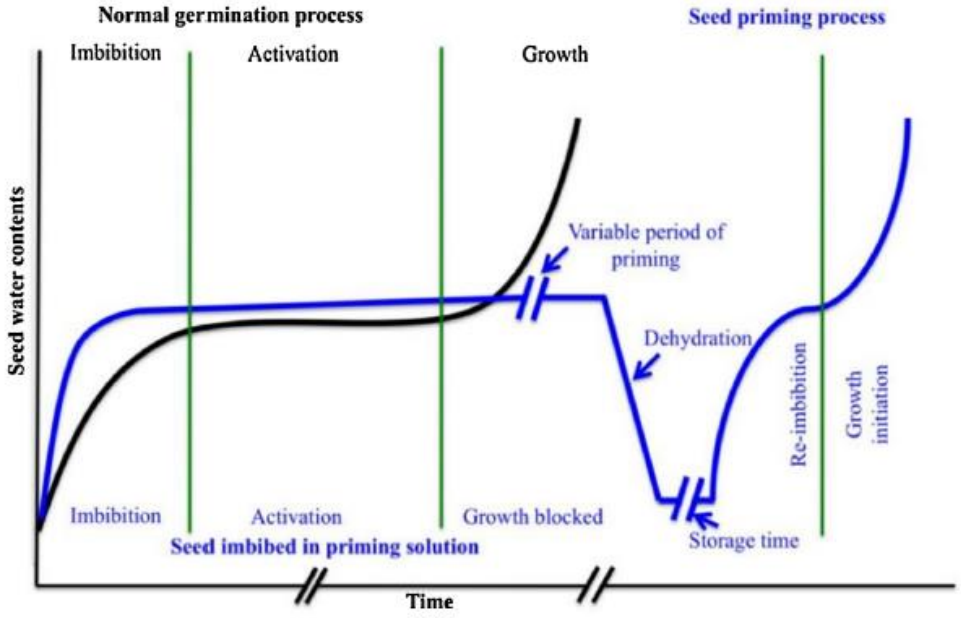


Figure 2. Schéma montrant le processus de germination normale et du processus de priming (Rajjou *et al.*, 2012).

3.2. Techniques d'amorçage des graines

il y plusieurs techniques d'amorçage utilisées et classées selon les agents de la solution. Celles-ci incluent l'hydropriming, l'osmopriming, l'halopriming, l'humidification, la stratification et le choc thermique. Les quatre premières approches sont les plus communes pour l'amorçage. Les agents d'amorçage communément utilisés incluent des sels inorganiques tels que le $CaCl_2$, le KNO_3, le Na SO_4et le NaCl.

3.2.1. Hydropriming

L’hydropriming est la technique d’amorçage la plus simple qui consiste à imbiber les semences avec l’eau distillée puis à les déshydrater avant de les semer (Ghassemi-Golezani *et al.,* 2008). Cette technique est peu coûteuse et évite l’utilisation de produits chimiques qui peuvent être néfastes pour l’environnement et la santé humaine (Ghassemi-Golezani *et al.,* 2008).

L‘hydropriming améliore la germination et la croissance des plantes en conditions normales et en conditions salines, Kaya *et al.* (2006) notent un effet améliorateur de la germination et de la croissance du tournesol sous stress salin.

L’hydropriming est efficace pour atténuer l’effet négatif de la salinité par l’amélioration de la germination et la croissance des variétés d’orges (Afzal *et al.,* 2006). Le mécanisme précis par lequel l’hydropriming améliore la germination, la croissance et le rendement des plantes en conditions normales et en conditions stressantes n’est pas bien connu.

3.2.3.Thermopriming

Thermopriming se réfère au traitement des semences à basse ou à haute température pour améliorer la germination et l'émergence des plantules dans des conditions environnementales défavorables.

Le traitement à basse température des semences chez certaines espèces est une pratique courante dans l'agriculture, soit pour protéger les graines contre la germination précoce dans des environnements inadaptés, soit pour améliorer positivement la germination.

Bien que le traitement des semences de présemis avecdes températures spécifiques soit efficace pour améliorer la germination des graines et l'émergence des plantules, il peut également améliorer la croissance et le développement ultérieurs des plantes. Cependant, il existe peu d'informations disponibles dans la littérature reflétant le rôle du traitement de la température des semences dans l'amélioration de la croissance et le

rendement des semences de différentes cultures dans des conditions salines.**Ashraf, M., and Foolad, M. R. (2005).**

3.2.4. Osmopriming

L'osmopriming est le type d'amorçage des semences le plus communément utilisé, qui consiste à faire subir aux graines un prétraitement osmotique seul ou suivi d'une déshydratation des graines avant l'apparition de la radicule.

Cette hydratation contrôlée des semences est réalisée grâce à des agents osmotiques tels que le polyéthylène glycol (PEG), les sels (KNO_3, NaCl, KCl) ou les polyols (mannitol).

L'amorçage des graines par l'osmopriming augmente l'activité de la majorité des enzymes impliquées dans la germination des graines et modifie la mobilisation des substances organiques vers différentes parties de l'embryon.

3.2.5.Halopriming

L'halopriming consiste à tremper les graines dans une solution de sels inorganiques. De nombreuses études montrent une amélioration considérable dans la germination des graines, l'émergence, la croissance et le rendement des plantes dans les sols affectés par la salinité suite à l'haloprimings des graines. L'acquisition de la tolérance à la salinité chez le concombre, induite par l'amorçage avec du $CaCl_2$, pourrait être due à l'activation du système antioxydant et à l'accumulation de la proline (Joshi *et al*., 2013).

Nakaune *et al*. (2012), concluent que les effets observés du priming par le NaCl sur la germination de la tomate, sont dus à une augmentation du contenu en gibbérelline, via l'activation du gène de biosynthèse de la gibbérelline, et une augmentation plus tard dans l'expression des gènes impliqués dans l'affaiblissement de l'endosperme. Le priming des

graines de piment avecdu NaCl, KCl et du $CaCl_2$ provoque une augmentation marquée des teneurs en proline (Aloui *et al.*, 2014).

3.2.4. Hormone-priming

Le prétraitement des graines avec des concentrations optimales de régulateurs de croissance peut améliorer efficacement la germination, la croissance et le rendement des récoltes sous les conditions normales et sous conditions de stress. Plusieurs régulateurs de croissance sont utilisés communément pour l'hormone-priming, y compris les auxines, les gibbérellines, l'acide abscissique, l'éthylène, l'acide salicylique, et l'acide ascorbique.

3.2.5. Chimio priming

Ce type de traitement consiste à imbiber les graines dans des solutions contenant des substances chimiques pendant des durées différentes à des concentrations précises. Ce traitement permet l'activation de certaines voies de signalisation permettant de meilleures performances germinatives. Ceci est possible par l'implication du Ca2+suite à une incubation en présence de CaCl2 d'une part, et du NO par utilisation du nitroprussiate de sodium.

3.3. Mécanismes de l'amorçage

L'amorçage des graines stimule le métabolisme de pré-germination et prépare les graines pour la sortie de la radicule. De plus, il réduit la résistance physique de l'endosperme pendant l'imbibition, répare les membranes et développe les embryons immatures. Par conséquent, les plantes émergent rapidement, ont une meilleure croissance et résistent aux conditions de stress .

Les changements physiologiques, biochimiques, cellulaires et moléculaires incluent, la division cellulaire et l'allongement, la fluidité de la membrane plasmique, l'induction des transcripteurs de protéines moléculaires de stress (*heat-shock proteins* et *late embryogenèses*

abundant proteins), et des changements dans l'activité du système antioxydant. De plus, l'amélioration dans le processus de germination des graines amorcées est liée à une augmentation du potentiel de synthèse des protéines.

La tolérance au stress est accomplie via deux stratégies. En premier, l'amorçage des graines induit une activation des processus pré-germinatifs, tels que le métabolisme énergétique, la mobilisation des réserves, l'expansion de l'embryon et la fragilisation de l'endosperme. Cela facilite le passage de l'état de graines sèches en dormance à un état de germination et mène à une amélioration du potentiel de germination.

Deuxièmement, l'amorçage impose un stress abiotique sur les graines qui empêche la sortie de la radicule, mais stimule les réponses au stress, et induit une tolérance croisée. Ces deux stratégies créent une 'mémoire d'amorçage' dans les graines qui peut être utilisée lors de l'exposition ultérieure au stress et leur permettre une grande tolérance à ce stress.

CHAPITRE 4 : MECANISMES DE RÉPONSES DES PLANTES AUX STRESS BIOTIQUES

INTRODUCTION

Dans leur lutte permanente pour la survie, les plantes ont développé un système de défense diversifié qui leur permet de résister à la plupart des agressions de nature biotique (champignons, bactéries, virus, plantes parasites, nématodes ou ravageurs) ou de nature abiotique (stress hydrique, thermique, ionisant, ou pollution, *etc*λ).

Généralement, La maladie est l'exception, la plante répond aux stress d'origine biotique ou abiotique par la mise en place de réactions de défense variées lui permet de résister aux agents pathogènes. Ces défenses consistent en premier lieu en des barrières physiques -cuticule et la paroi cellulaire- qui empêchent la pénétration de la plupart des microbes. Si l'agent pathogène pénétre la plante et que la maladie se développe, la plante est dite sensible et l'interaction est compatible.

Dans le cas contraire, si le parasite parvient à franchir les premières lignes de défense, la plante va déclencher des réactions de défense inhibant le développement de la maladi e: la plante est résistante et l'interaction est incompatible ce qui se traduit, dans la plupart des cas, par la mort rapide des cellules infectées et la formation de lésions nécrotiques localisées autour des sites de pénétration du parasite. Il s'agit de la réaction d'hypersensibilité, ou RH, qui s'accompagne de modifications métaboliques importantes permettant de confiner l'agresseur à son site de pénétration.

La RH est une forme de mort cellulaire programmée ; son déroulement nécessite d'abord la reconnaissance par la cellule hôte d'un éliciteur suivie par des événements de signalisation, de transcription d'un grand nombre de gènes de défense et de production de molécules de défense.

Des facteurs spécifiques de la plante et de l'agent pathogène déterminent la nature des interactions physiques, chimiques ou biologiques qui, s'établissant dans les tous premiers

moments de leur rencontre, conditionnent l'évolution vers la résistance (incompatibilité) ou la sensibilité (compatibilité), autrement dit vers l'expression rapide ou non des mécanismes de défense. Cependant, dans la littérature, le terme RH au sens large qualifie un mécanisme de défense des plantes qui englobe la mort cellulaire et les réponses de défense associées au niveau local.

A cette résistance s'associent deux résistances acquises : l'une locale (LAR), sur une zone de quelques millimètres autour de la zone infectée qui a été proposé comme zone de production des signaux nécessaires à l'établissement de la seconde, la résistance systémique acquise (SAR), plus tardive et moins intense, qui met la plante dans un état de veille et la maintient prête à réagir à une attaque ultérieure.

A. Les mécanismes de la résistance spécifique des plantes aux parasites

La nature exacte des événements qui conduit à la mort cellulaire est largement étudiée. Ces études concernent le contrôle génétique des phénomènes de reconnaissance intervenant entre la plante et le microorganisme pathogène, les signaux requis pour sa mise en œuvre, la régulation et l'exécution du programme de mort cellulaire et l'activation de gènes de défense (Figure 1).

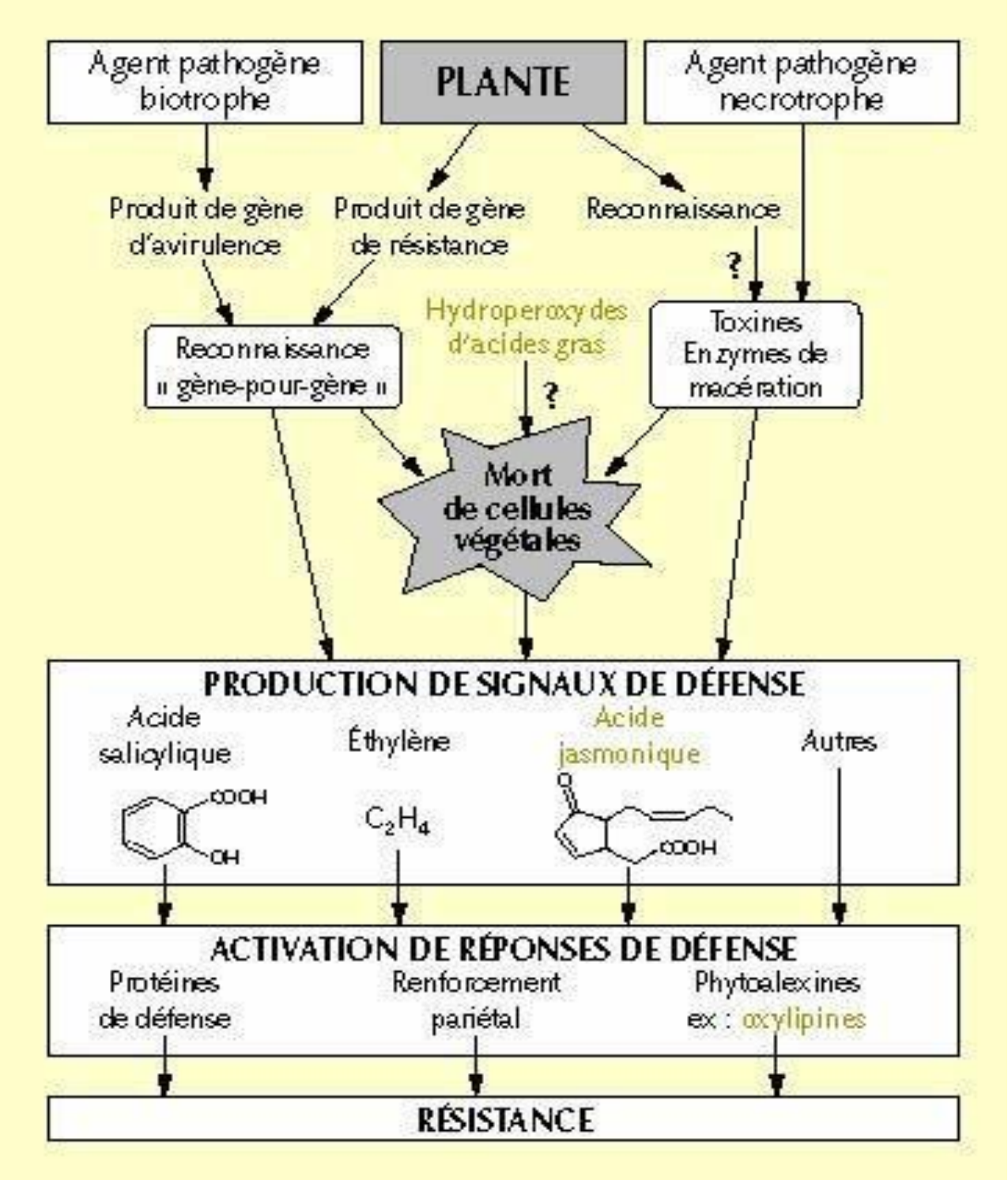


Figure 1. Événements de reconnaissance, de signalisation et réactions de défense conduisant à la mise en place d'un état de résistance. (D'après Heitz *et al.*, 2002).

1. Le phénomène de reconnaissance

Deux types de reconnaissance peuvent être proposés : **la reconnaissance spécifique** qui fait intervenir le produit du gène de résistance de la plante et le produit du gène d'avirulence du pathogène correspondant et **la reconnaissance non spécifique** qui implique des éliciteurs généraux.

1.1. La reconnaissance par les éliciteurs généraux

Un éliciteur est une molécule capable d'induire au moins une des réponses typiques de défense, comme la synthèse de phytoalexines, cela en l'absence de toute infection. La caractéristique principale des éliciteurs généraux est qu'ils ne reproduisent pas la spécificité de reconnaissance gène pour gène (Keen, 1990, 1992).

Ils sont produits soit par les agents pathogènes (éliciteurs exogènes) ou des plantes (éliciteurs endogènes) (Figure 2). Ils sont de nature polysaccharidique, lipidique, ou (glyco) protéique.

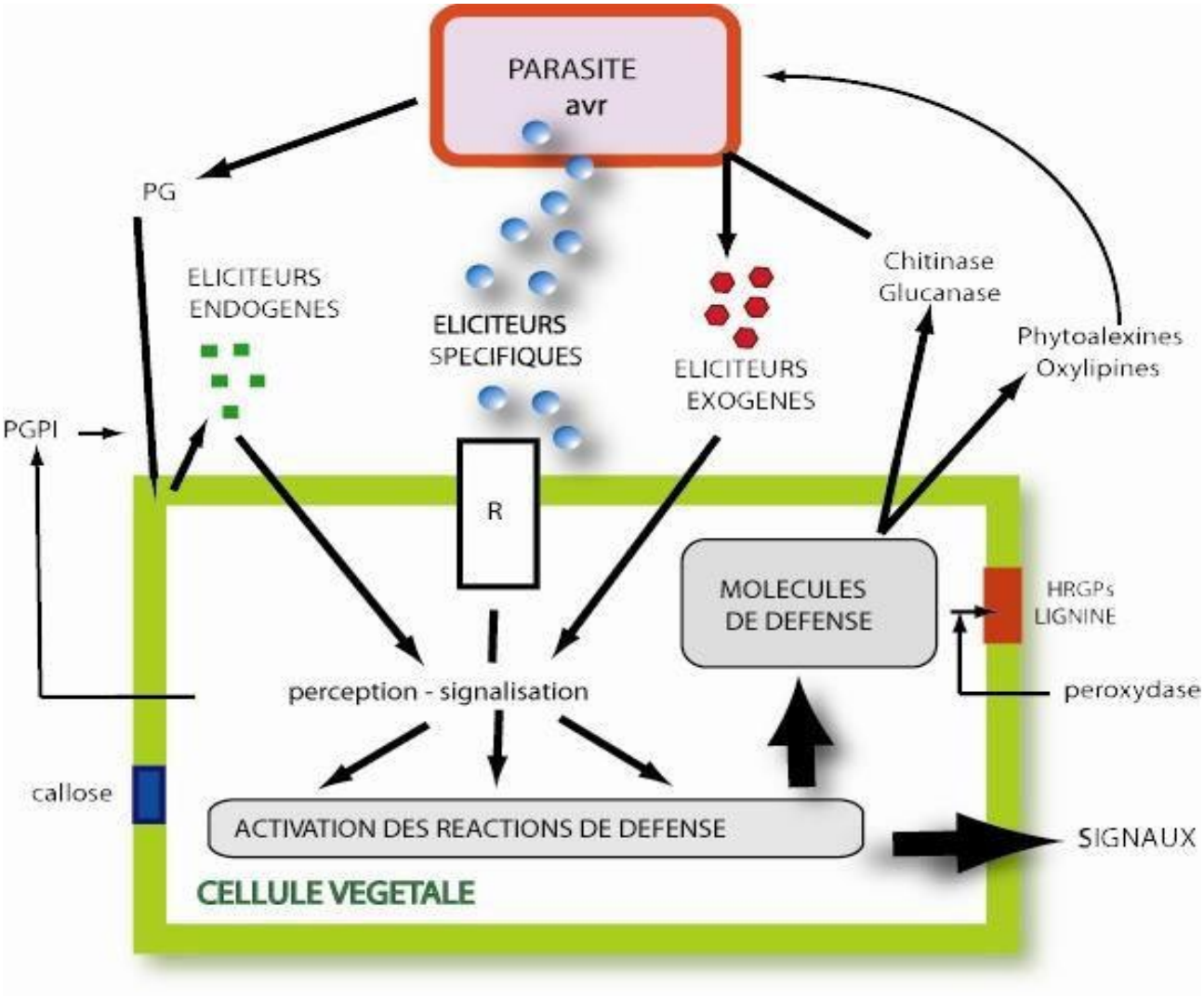


Figure 2 : La reconnaissance par les éliciteurs généraux
PG : phosphatidylglycérol ; PGPI : Plant Growth Promoting Bacteria ; HRGPs : Hydroxyprolin-rich GlycoProtein.

Trois types majeurs d'éliciteurs de nature polysaccharidique ont été identifiés : les □-1,3 glucanes, la chitine et le chitosan (chitine dé-acétylée) provenant des parois fongiques et les oligogalacturonides, résidus d'acides galacturoniques en liaison □-1,4 dérivés de la pectine, issus des parois cellulaires. On peut insister sur le fait que la plupart de ces éliciteurs polysaccharidiques endogènes ou exogènes est généré par des hydrolases de l'hôte et/ou de l'agresseur. Ces molécules peuvent donc probablement intervenir comme signaux de « deuxième génération » dans la cascade de réception-transduction

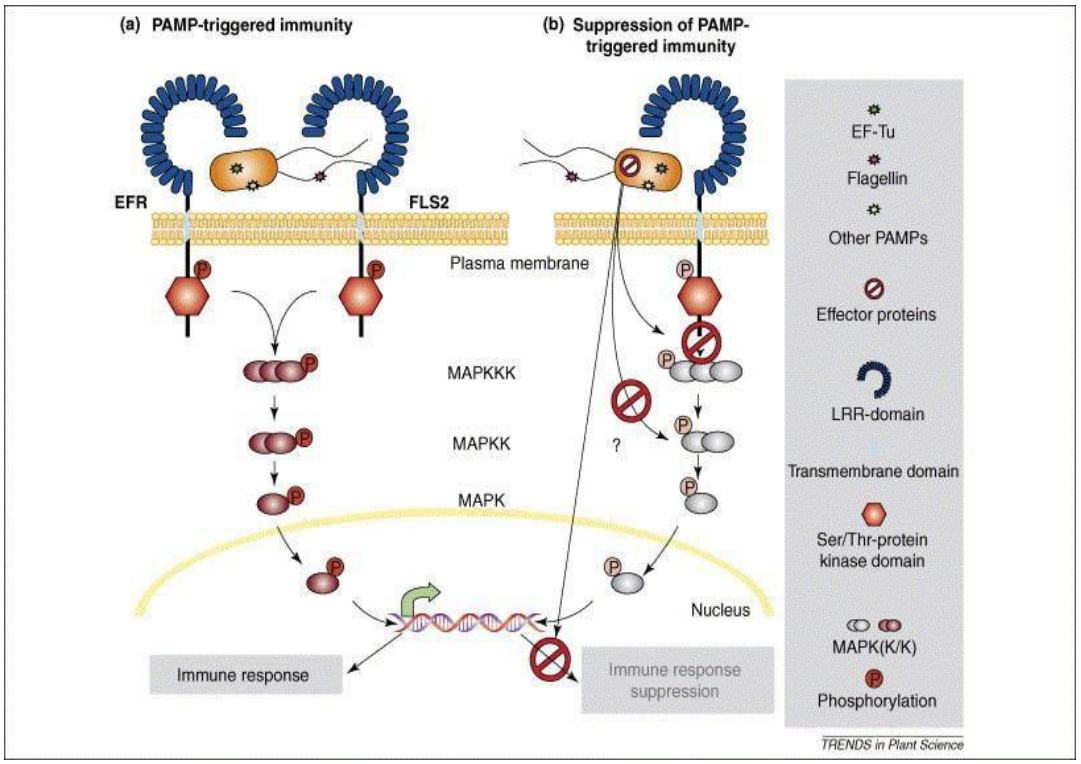
participant à l'expression des réponses de défense.

Parmi les éliciteurs lipidiques, l'acide arachidonique et d'autres acides gras insaturés, libérés lors de l'infection de la pomme de terre par *Phytophthora. infestans,* figurent parmi les éliciteurs les plus efficaces de la synthèse de phytoalexines et de l'activité lipoxygénase (LOX) (Bostock *et al.*, 1992). L'ergostérol, qui est le stérol majeur de la membrane lipidique chez les champignons, induit l'alcalinisation du milieu de culture de suspensions cellulaires de tomate, alors que les stérols d'origine animale ou végétale n'ont aucun effet. Enfin, les syringolides, éliciteurs race-spécifique générés par la bactérie *Pseudomonas. syringae* pv. *tomato* portant le gène *AvrD,* induisent une RH chez les cultivars de soja portant le gène *Rpg4* .

Les éliciteurs protéiques et glycoprotéiques sont capables d'induire une RH au même titre que les éliciteurs race-spécifiques, d'autres induisent seulement des réponses de défense sans mort cellulaire. On distingue ainsi des peptides correspondant à des domaines de la flagelline des eubactéries, de protéine bactérienne PopA1 isolée de *Ralostonia solanacearum* ou des harpines et des élicitines.

Comme on peut le constater, il existe une grande diversité au sein des molécules susceptibles d'être reconnues par la plante mais aussi une grande diversité dans la spécificité de la perception. La perception des éliciteurs implique parfois une certaine spécificité, puisque certains éliciteurs ne sont actifs que sur une gamme donnée d'espèces végétales. Cependant, la plupart de ces molécules sont capables d'activer des mécanismes de signalisation et de défense communs. Il semble dès lors que les étapes de transduction de signaux et l'expression de réponses de défense en aval des événements de reconnaissance impliquent des mécanismes très conservés chez les plantes. Des études ont permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la transduction du signal intracellulaire aboutissant à l'activation des réponses de défense et de la mort

cellulaire. Le modèle le plus fréquent repose sur l'affinité d'éliciteurs pour des récepteurs membranaires à l'origine d'une cascade d'événements qui va conduire à l'induction de l'expression de gènes de défense.



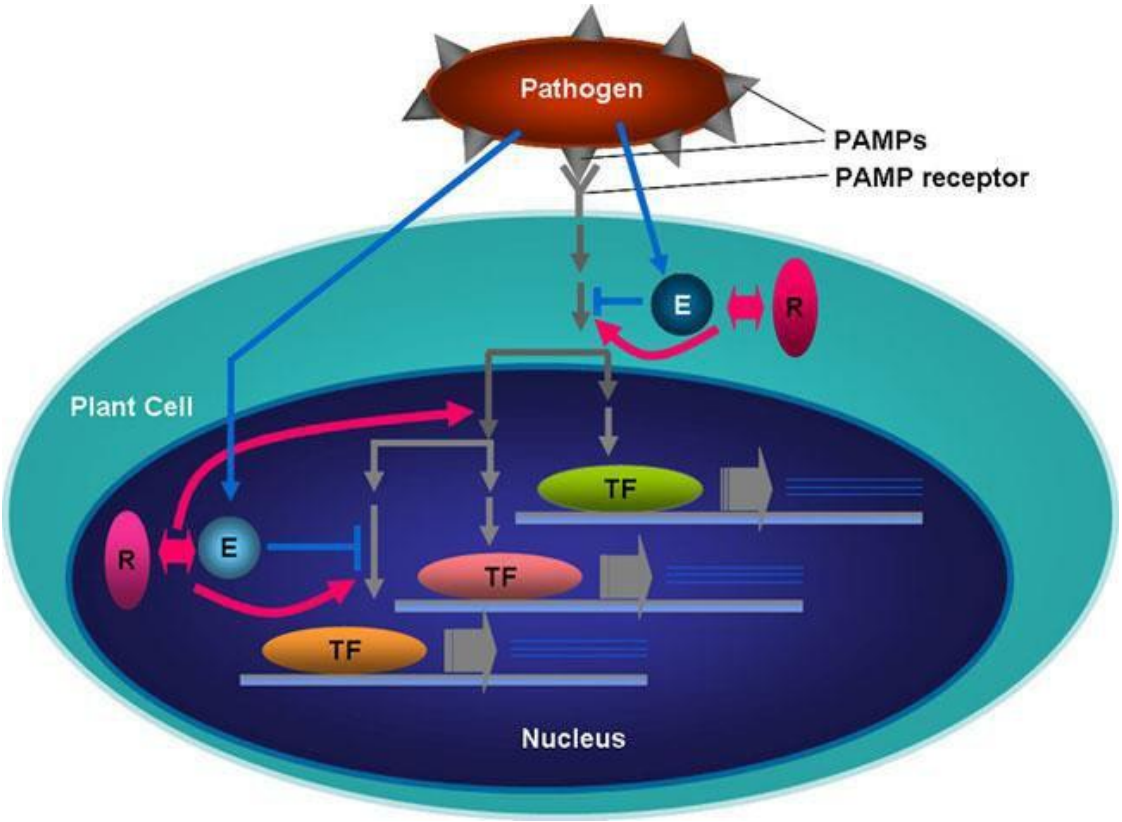


Figure 3 : La reconnaissance par les « PAMPs », (Pathogenesis-associated Molecular Patterns) TF : Transcription factors : E : Effector

De nombreux éliciteurs exogènes appartiennent à la catégorie des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) (Figure 3). Ce sont des molécules de l'agent pathogène indispensables à son mode de vie et très conservées d'une espèce à l'autre et qui n'existent pas chez la plante.

La reconnaissance de ces «PAMPs» fait intervenir des récepteurs spécifiques nommés PRR pour (Pattern Recognition Receptors) au niveau de la surface cellulaire, et engendre la génération de signaux qui induisent un mécanisme nommé PTI (Pathogen- Triggered Immunity).

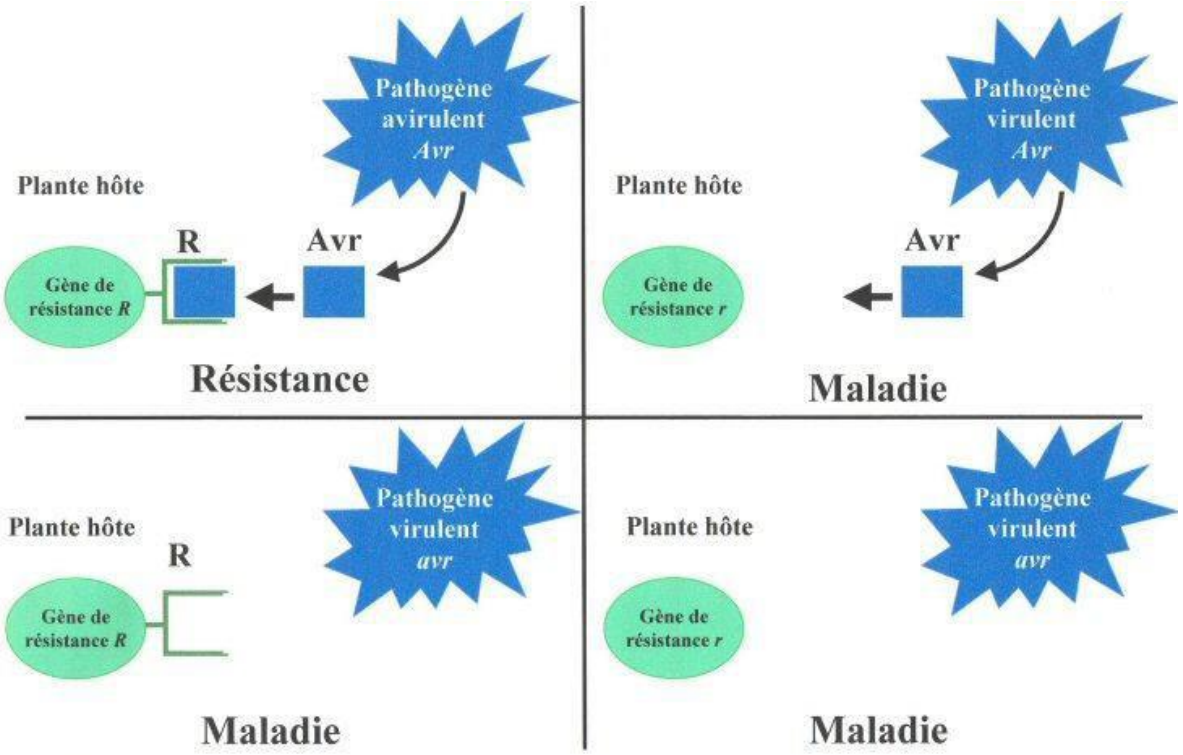


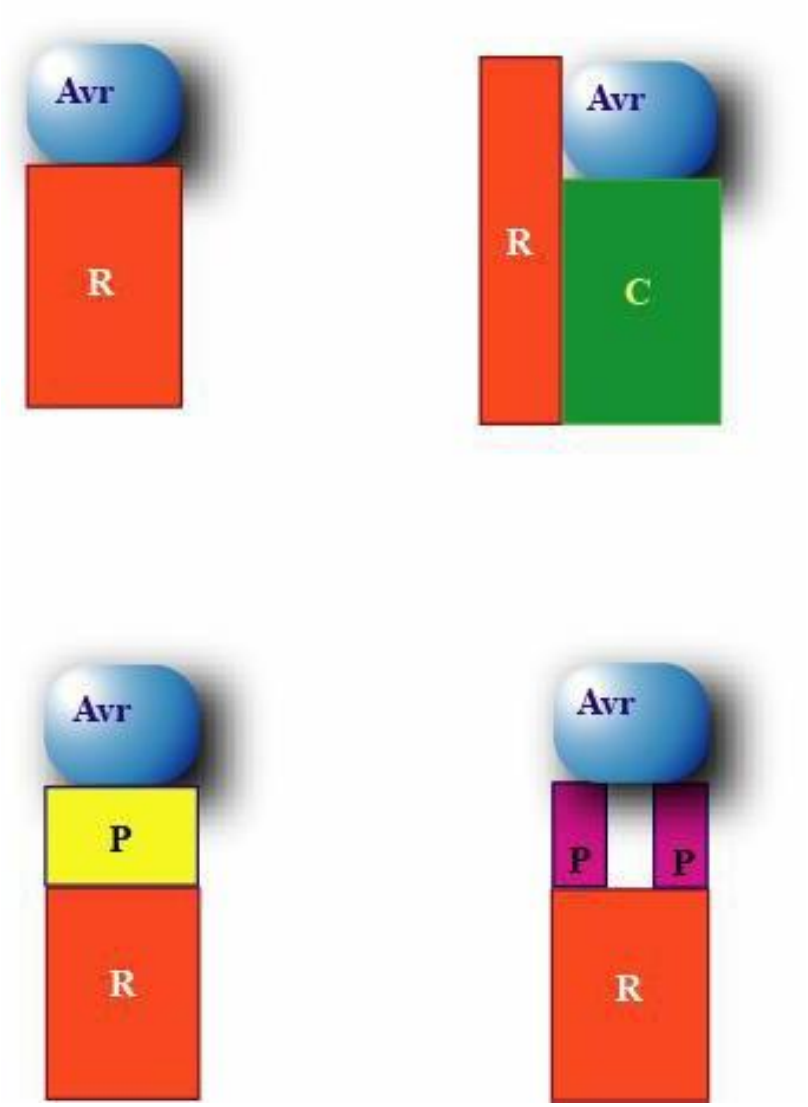
Figure 4 : la théorie gène pour gène

1.2. La reconnaissance spécifique repose sur le modèle « gène pour gène »

Dans certains cas de maladies microbiennes, la résistance est spécifiée par la présence chez la plante d'un gène de résistance (*R*) dominant auquel correspond chez le pathogène un gène d'avirulence (*Avr*) également dominant. Cette relation est appelée « gène pour gène » (Figure 4). L'existence des gènes d'avirulence a été découverte à l'issue d'une étude sur l'interaction entre le lin et *Melampsora lini* (Flor, 1942).

Flor définit ainsi cette base génétique de la spécificité entre pathogène et hôte. Plusieurs modèles ont été proposés pour donner une interprétation physiologique de la reconnaissance « gène à gène ». Parmi eux le modèle ligand/récepteur qui postule que le produit du gène d'avirulence (*Avr*) joue le rôle de ligand spécifiquement reconnu par un récepteur codé par le gène de résistance (*R*).

Il a été validé par des preuves biochimiques et moléculaires à l'aide du système double-hybride dans la levure pour deux couples *Avr/R*. Il s'agit de l'interaction entre *Avr Pto/Pto* chez la tomate et *Avr pita/pita* chez le riz. L'autre modèle proposé est dit «modèle de garde», où la reconnaissance implique la présence de protéines R dites de « garde » et d'une protéine cible reconnue par la protéine Avr. L'interaction protéine Avr-protéine cible induit des modifications de la protéine cible qui sont perçues par la protéine R de garde pour déclencher les mécanismes de la HR (Figure 5).



A : Résistance par interaction directe
B-1,2,3 : Résistance par interaction indirecte : le modèle de garde
C: Protéine cible **P**: protéine helper

1.2.1. Les gènes d'avirulence (*Avr*)

De nombreux gènes d'avirulence ont été clonés chez les virus, les bactéries et les champignons. La plupart des protéines Avr sont en fait des facteurs de virulence requis pour développer la maladie lorsque la plante ne possède pas les récepteurs nécessaires à la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène.

Cependant, chez des plantes résistantes, ces effecteurs sont reconnus par des protéines R et vont déclencher les mécanismes de la RH. L'expression de gènes *Avr* chez

des hôtes sensibles peut également provoquer des symptômes de la maladie identiques à ceux induits par l'agent infectieux (Figure 6).

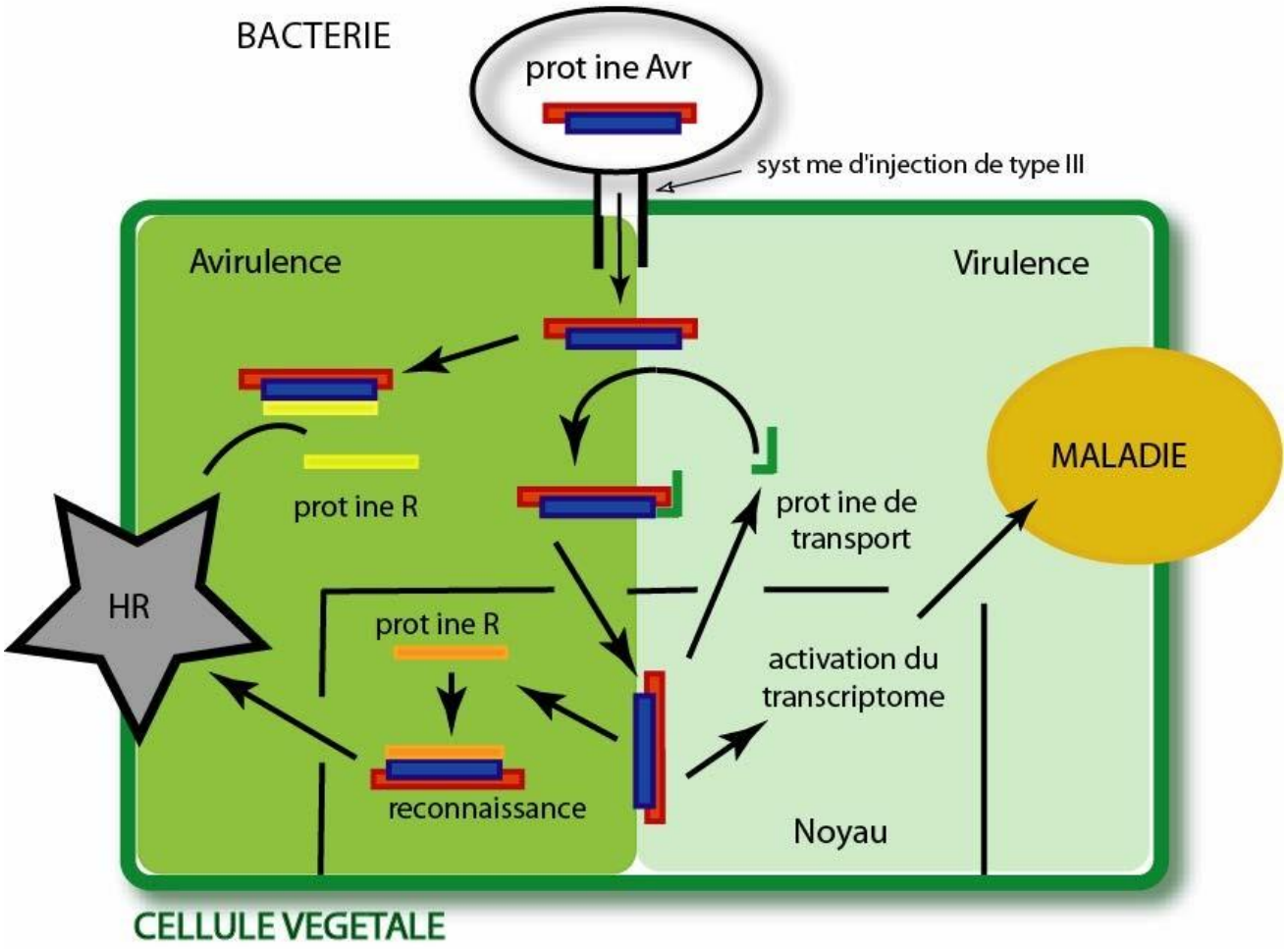


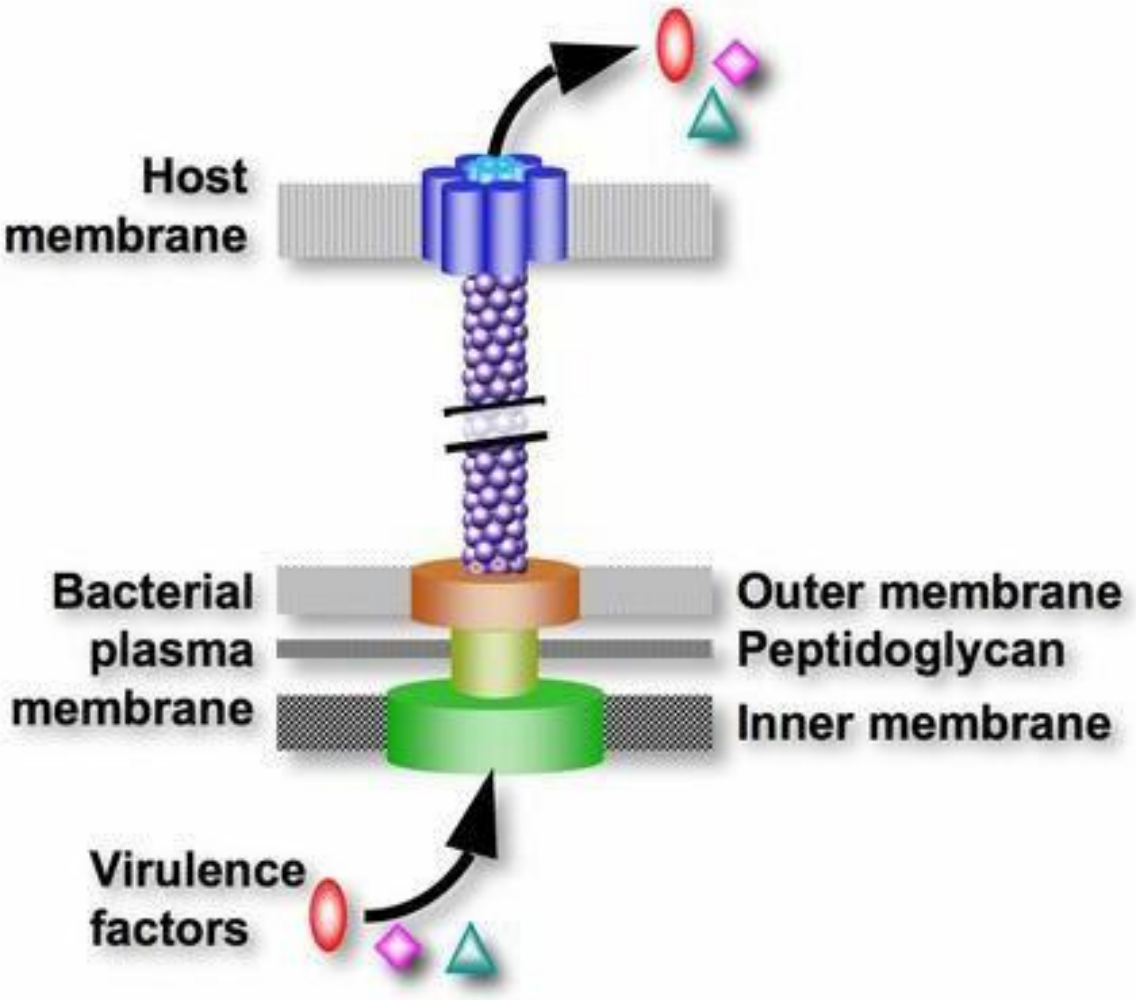
Figure 6 : Modèle concernant l'interaction entre les protéines (virulentes ou avirulentes) et la cellule végétale
La protéine Avr est sécrétée dans la cellule végétale par un système de sécrétion de type III. La HR est induite suite à la reconnaissance spécifique entre les protéine R et Avr.

Le premier gène d'avirulence bactérien isolé et cloné a été le gène *AvrA* de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* race 6 (Staskawicz *et al.*, 1984). Ce gène induit l'hypersensibilité dans les cultivars de soja, portant le gène de résistance *Rpg2*. Depuis, plus de trente gènes *Avr* ont été isolés, aussi bien lors d'interactions avec des virus qu'avec des agents fongiques ou bactériens du genre *Pseudomonas* et *Xanthomonas* .

Mais la fonction biologique de ces gènes n'est pas déterminée pour la plupart des agents pathogènes. Les gènes *Avr* bactériens codent, dans la plupart des cas, pour des

protéines solubles intracellulaires contrairement à celles codées par les gènes de champignons qui sont extracellulaires.

D'une manière générale, les gènes *Avr* codent soit pour des produits ayant une activité élicitrice directe des réponses de défense tel le produit du gène *Avr9* (un peptide nommé AVR9) isolé du champignon *Cladosporium fulvum* sur tomate et les protéines de la capside du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT), soit pour des enzymes impliquées dans la synthèse de molécules élicitrices, comme *AvrD* de *Ps. syringae* qui code une enzyme impliquée dans la synthèse de dérivés lipidiques, les syringolides, responsable de l'induction d'une RH sur certains cultivars de soja. Chez *Ps. syringae*, plus de 40 effecteurs représentent des candidats pouvant être injectés dans les cellules des plantes hôtes. Les produits des deux gènes *Avr4* et *Avr9* induisent une RH dans des cultivars de



tomate portant respectivement des gènes de résistance *Cf-4* et *Cf-9*.

Figure 7 : représentation schématique du système de sécrétion de type III (TTSS)

Chez les bactéries, le fonctionnement des gènes *Avr* dépend de celui des gènes *hrp* (**h**ypersensitive **r**eaction and **p**athogenicity). La particularité des produits de gènes *Avr* est de ne pas posséder de peptide signal et donc de ne pas être sécrétés par les bactéries qui utilisent le système de transport de protéines chez la plante leur permettant de transpercer la paroi cellulaire et d'injecter dans les cellules les protéines effectrices qui seront reconnues par des protéines R. Ce système codé par les gènes *Hrp* est appelé système de sécrétion de type III (TTSS) (Figure 7), ou injectisome ; il a été mis en évidence chez *Yersinia* . En effet, il faut que les produits Avr pénètrent à l'intérieur de la cellule végétale pour induire une RH. Des mutants *hrp*, possédant des gènes *Avr* fonctionnels, sont incapables de déclencher une RH dans des cultivars possédant les gènes de résistance correspondants.

Cette machinerie protéique complexe, présente chez les bactéries Gram négatif, permet l'injection de protéines effectrices à travers la membrane des cellules cibles eucaryotes, il est composé d'au moins 20 protéines.

Certaines protéines Avr possèdent des séquences consensus d'adressage vers des compartiments cellulaires particuliers: membrane cytoplasmique ou noyau cellulaire. La destruction de ces motifs d'adressage annihile la fonction d'avirulence.

1.2.2. Les gènes de résistance

Depuis 1992, des gènes de résistance ont été clonés chez différentes espèces végétales. Cette avancée dans la compréhension des interactions plante/pathogène n'a été possible qu'après la généralisation des techniques de mutagenèse insertionnelle par transposons, en particulier par ceux du maïs, efficaces sur diverses espèces (maïs, tomate,

tabac, lin, *Arabidopsis*) (.

Le premier gène de résistance cloné a été le gène *Hm1* du maïs. Il confère la résistance vis- à-vis de *Cochliobolus carbonum* race 1. *Hm1* code pour une réductase impliquée dans la détoxification de la toxine HC de *C. carbonum*. En 1993, Martin et ses collaborateurs ont cloné le gène de résistance *Pto* de la tomate qui confère la résistance vis-à-vis des races de *Ps. syringae* pv. *tomato* portant le gène *AvrPto*. Le gène *Pto* code pour une sérine- thréonine protéine kinase. La reconnaissance du ligand par le produit du gène *Pto* se traduirait par un signal secondaire de transduction (phosphorylation) activant les gènes de défense de la plante.

Bien que les gènes de résistance (*R*) aient été isolés de différentes plantes et interagissent avec des gènes *Avr* de bactéries, de champignons ou de virus, ils présentent des régions analogues comprenant des séquences répétées riches en leucine (LRR), à l'exception du gène *Pto* de la tomate. Ces motifs sont communs aux protéines végétales ou animales impliquées dans les interactions protéine-protéine (récepteurs), et dans des mécanismes de transduction (phosphorylation).

D'autres caractéristiques structurales permettent ensuite de définir plusieurs sous-groupes (Figure 8). Il s'agit de la présence dans la protéine de sites de liaison à des nuléotides (NBS), de domaine « leucine zipper » (LZ), de domaines sérine / thréonine kinase – LRR-Kinase) et de domaines Toll/interleukine-1 (TIR). Par exemple, le domaine TIR, comme son nom l'indique, présente des homologies de séquence avec le domaine cytoplasmique de la protéine Toll de la drosophile et le récepteur de l'interleukine-1 (IL-R) de mammifère. Les produits de gènes *R* possédant ce domaine pourraient être à l'origine d'une cascade de signaux intracellulaires similaire à celle décrite pour Toll et IL-R chez les animaux.

Les produits des gènes de résistance qui semblent être localisés dans le cytoplasme sont impliqués dans la reconnaissance de produits des gènes *Avr* viraux ou bactériens, dont l'activité nécessite une localisation intracellulaire ou le seul membre de cette famille est le gène R *Xa21* qui code une protéine qui possède un domaine serine/thréonine kinase intracellulaire, confèrant la résistance à une trentaine de souches de *Xanthomonas oryzae*. A l'opposé, les produits des gènes *R* trans-membranaires possédant un domaine LRR extracellulaire confèrent la résistance à des champignons se développant dans l'apoplasme où ils libèrent leurs facteurs *Avr*. C'est par exemple des produits des gènes de résistance *Cf2, Cf4, Cf5, Cf9* et des facteurs d'avirulence Avr2, Avr4, Avr5, Avr9 dans l'interaction tomate/ *Cladosporium fulvum*. Enfin, il apparaît aujourd'hui que le modèle gène pour gène requiert non seulement les déterminants R et Avr, mais également d'autres protéine-hôtes s'associant au binôme R/Avr pour activer la défense ; l'appellation « résistosome » a été proposée pour ce complexe protéique.

Le système de reconnaissance R/avr permet à la plante de reconnaître spécifiquement son agresseur et d'activer une cascade d'évènements qui vont lui permettre de résister. Dans le cas de l'interaction incompatible, les mécanismes de défense induits consécutivement à cette reconnaissance gène-gène vont conduire à la RH, une mort cellulaire programmée destinée à bloquer le développement de l'agression parasitaire.

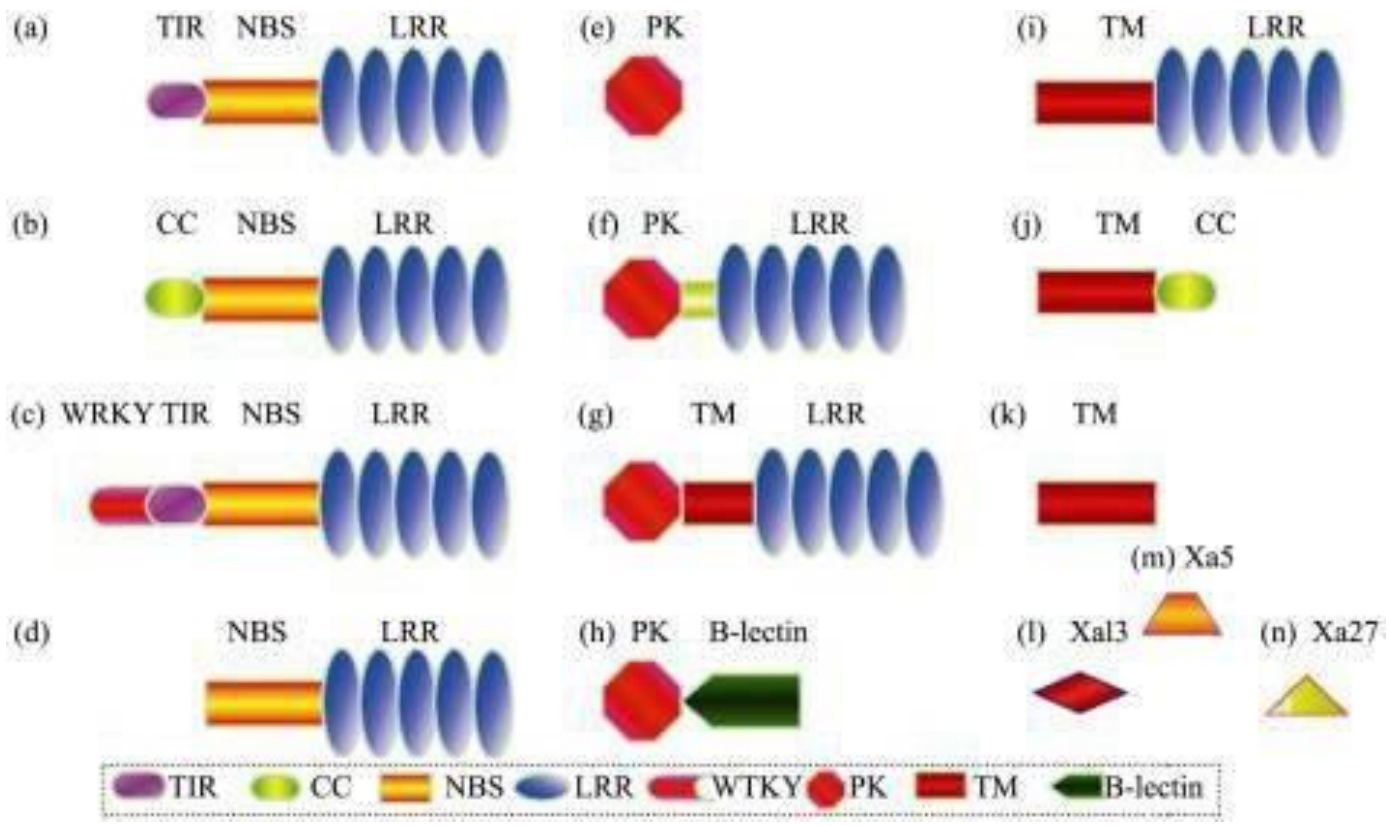


Figure 8 : Représentation schématique des classes majeures de protéines de résistance connues.

(**NBS**: nucleotide-binding site; **LRR**: leucine-rich repeat; **TIR**: Toll- interleukin-1 receptor; **CC**: coiled-coil; **TM**: transmembrane domain; **PK**: Protein Kinase; **WRKY**: WRKY domain; **B-lectin**: bulb-type mannose specific binding lectin domain) (d'apres Liu *et al.*, 2007).

2. La mort cellulaire hypersensible

Chez la plante, il existe un programme de mort cellulaire qui, inactivé dans les conditions normales, est induit sous l'effet d'une stimulation par un organisme pathogène. Elle a été décrite pour la première fois, il y a une centaine d'années, à partir d'observations réalisées sur le pathosystème blé-*Puccinia dispersa*. Le terme «Hypersensitive Reaction » est utilisé pour la première fois par Stakman (1915) pour dénoter la réponse de l'avoine, du seigle, du blé et l'orge à l'inoculation par le champignon *Pu. graminis*; il a observé une mort cellulaire rapide et anormale suite à l'attaque de certains cultivars par *Pu. graminis*.

La mort cellulaire de type hypersensible se manifeste phénotypiquement par l'apparition de lésions nécrotiques localisées aux sites de pénétration de l'agent pathogène.

La RH est un phénomène ubiquiste qui peut toucher tous les types de cellules ; elle joue un rôle important dans le développement et à la réponse au stress et permet l'élimination des cellules inutiles ou dangereuses pour l'organisme.

Des travaux présentent des arguments qui suggèrent que la mort cellulaire de type hypersensible est génétiquement programmée. La RH nécessite la transcription de gènes et la traduction de gènes spécifiques démontrant qu'elle résulte d'un processus actif contrôlé génétiquement, et pas nécessairement de dommages dûs à l'agent pathogène. L'expression de certains transgènes conduit, dans certains cas, à l'induction d'une mort cellulaire semblable à celle de la RH.

L'une des approches développées pour identifier des gènes impliqués dans le contrôle et l'exécution de la mort cellulaire associée à la HR est l'utilisation de mutants dont ceux présentant spontanément des lésions de type HR (LMM, pour Lesion-Mimic Mutants). Ces mutants présentent des phénotypes différents, selon la cinétique d'apparition des lésions et la couleur ou la taille des lésions. Deux classes de LMM ont été identifiées,

des mutants d'initiation et de propagation reposant sur l'idée que deux mécanismes différents sont impliqués dans la régulation de la mort cellulaire : un mécanisme contrôlant l'initiation de la mort cellulaire et un mécanisme régulant sa suppression.

L'identification des mutants *lsd* (lesion stimulating disease resistance response) et des mutants *acd* (accelerated cell death) d'*A. thaliana,* présentant spontanément des plages nécrotiques semblables à des RH sur toute la plante, milite en faveur de la présence d'une mort cellulaire génétiquement contrôlée.

Chez ces mutants, il semblerait que l'étape de reconnaissance/stimulation ait été court-circuitée. Les réactions de défense sont déclenchées par une dérépression d'une étape ne dépendant que de la plante. Dès que cette étape est franchie, la suite du programme de mort cellulaire est enclenchée et les lésions apparaissent. Bien que la mort soit souvent une réponse de défense observée dans les interactions plante/microorganisme pathogène, son rôle dans la résistance n'est cependant pas encore très clair.

D'autres mutants *dnd1* (defense, no death) d'*A. thaliana,* ayant des flux de cations K^+ et Ca^{2+} perturbés, sont incapables d'activer la mort cellulaire hypersensible. Cependant, ils sont toujours résistants à l'infection par une souche avirulente de *Ps. syringae*. En fait, ces mutants *dnd1* possèdent un niveau très élevé d'AS et expriment de manière constitutive des protéines PR. L'expression du gène *nahG* dans ces mutants *dnd1* entraîne la perte de la résistance vis-à-vis des souches virulentes ou avirulentes de *Pseudomonas* sans développer une mort cellulaire hypersensible. Ce travail montre que la mort cellulaire hypersensible n'est pas nécessaire au processus de résistance race/cultivar et suggère, en revanche, que l'expression des réponses de défense est suffisante pour que cette résistance s'établisse.

Les travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui sur le suicide cellulaire ont conclu qu'il existe des gènes dont la présence permet le contrôle de la vie et de la mort des cellules. Ces

gènes permettent aux cellules de fabriquer des molécules qui interagissent entre elles. Parmi elles, des composés toxiques comme les ROS, ainsi que des nucléases et des cystéines ou sérine-protéases sont directement impliquées dans les mécanismes d'exécution du programme de mort cellulaire.

L'apoptose de la cellule animale est une forme particulière de mort cellulaire programmée, distincte de la nécrose, au cours de laquelle une cascade d'événements se met en place dans les différents compartiments des cellules pour conduire à des changements structuraux caractéristiques. Lors de l'apoptose, la membrane plasmique s'invagine, le noyau et le cytoplasme se condensent, des corps apoptotiques qui correspondent à des vésicules membranaires contenant des fragments d'acide nucléique se forment, l'ADN se segmente en fragments de grande taille d'environ 50 kb et/ou de petite taille correspondant à la zone internucléosomale (180 à 200 pb) dont l'extrémité 3'OH libre implique l'intervention d'une endonucléase (DNA laddering) . Une ou plusieurs de ces caractéristiques morphologiques apparaissent lors de la RH mise en place par la plante pour confiner l'agent pathogène à son site de pénétration.

Ainsi, des protoplastes de tomate traités par un éliciteur lipidique, l'acide arachidonique, qui permet de développer une RH, montrent une fragmentation de l'ADN en multiples éléments dont les extrémités sont 3'OH libres (Greenberg, 1997). De plus, sur des cultures cellulaires de soja ou sur des tissus d'*A. thaliana,* l'infection par des bactéries avirulentes entraîne l'apparition de fragments d'ADN de grande taille et de formes semblables à des corps apoptotiques. Une fragmentation de l'ADN nucléaire et l'induction d'endonucléases spécifiques ont aussi été observées dans les cellules de tabac au cours de la RH contre le VMT.

Ainsi, un clivage de l'ADN nucléaire en nucléosomes a été observé au cours de l'interaction incompatible entre la dolique et le champignon *Uromyces vignae*. Enfin, le traitement des plantes de pois par un éliciteur fongique ou par le cyanure de potassium (KCN) favorise la fragmentation de l'ADN.

L'ensemble de ces observations montre que la mort cellulaire de type hypersensible chez les plantes présente certaines caractéristiques de l'apoptose chez les animaux. Il semble qu'il existe des mécanismes similaires qui pourraient gouverner le phénomène de mort cellulaire programmée chez les plantes et les animaux.

De nombreuses données indiquent que les ROS participent à l'induction de la mort cellulaire tant chez la cellule végétale que chez la cellule animale. Des résultats montrent que les ROS sont impliquées dans la mort cellulaire hypersensible chez les végétaux. Au cours de la RH induite sur des cultures cellulaires de soja infectées par une race avirulente de *Ps. syringae,* le taux de cellules mortes a fortement augmenté lorsque l'accumulation d'H_2O_2 est accrue en présence d'aminotriazole (un inhibiteur de catalase). Ainsi, l'addition aux suspensions cellulaires de soja d'un inhibiteur des protéines kinases comme K252A et la staurosporine, bloque entièrement le choc oxydant induit par l'éliciteur Pmg, un glucan issu de champignon *P. megasperma f.* sp. *glycinea,* mais sans inhiber totalement la mort cellulaire induite par la bactérie avirulente. De plus, au cours de l'interaction tabac/VMT, la mort cellulaire de type hypersensible est fortement corrélée à une diminution de l'expression d'une ascorbate peroxydase, une enzyme impliquée dans la détoxication des ROS.

L'implication de ces ROS dans les réactions de défense et de mort cellulaire *in vivo* a été démontrée grâce à des mutants et des plantes transgéniques Chez *Arabidopsis,* le gène *lsd1* coderait pour une protéine en « doigt de zinc » fonctionnant comme un régulateur

négatif de la mort cellulaire végétale. De manière intéressante, les mutants *lsd1* sont incapables de détoxiquer $O_2^{\cdot-}$ produit par des feuilles élicitées. L'infiltration de DPI (diphénylène iodonium) dans ces feuilles permet à nouveau de contrôler la progression de la RH. Ces auteurs suggèrent que $O_2^{\cdot-}$ serait l'élément nécessaire au développement de la RH et donc de la mort cellulaire. Ainsi, l'expression d'un transgène codant pour une enzyme produisant H_2O_2 dans la pomme de terre, induit une résistance à différents microorganismes pathogènes. Par ailleurs, des plants de tabac n'exprimant plus la catalase Cat1 présentent des lésions nécrotiques de type RH. Chez les plantes, la mort cellulaire programmée semble donc être associée aux ROS aux fonctions variables avec les peroxysomes, les mitochondries et les chloroplastes comme organites sources.

Chez les mammifères, des protéines de la famille Bcl-2 (**B**-**c**ell **l**ymphoma-**2**) sont fortement impliquées dans la régulation de l'apoptose. La surexpression de Bcl-2 supprime complètement la peroxydation des lipides et protège des lymphocytes d'homme et de souris de l'apoptose induite par l'application des hydroperoxydes lipidiques ou du H_2O_2.

L'expression d'un activateur de l'apoptose (Mitochondria-targed Bax triggered cell death) chez le tabac induit des lésions semblables aux lésions RH. Chez les animaux, les cystéines protéases, encore nommées caspases, sont impliquées dans l'exécution de l'apoptose.. En utilisant des oligopeptides synthétiques,

«substrats» des caspases, et des inhibiteurs de caspases, des activités de type caspase ont pu être mises en évidence chez les plantes. Une activité de type caspase a été détectée au cours de la RH de tabac en réponse au VMT. Des recherches ont mis en évidence l'existence de deux familles présentant des activités de type caspase : les paracaspases, présentes chez les animaux (Yu et Lenardo, 2003), et les métacaspases, présentes chez les plantes.

L'utilisation des inhibiteurs spécifiques de caspases sur des cultures cellulaires de soja, montrent que l'utilisation des inhibiteurs de cystéine-protéases inhibe la mort cellulaire induite par l'application du H_2O_2 ou par une souche avirulente de *Ps. syringae* pv. *glycinea*. L'ensemble de ces observations peut indiquer qu'il existe certaines similitudes entre l'apoptose chez les animaux et la mort cellulaire hypersensible chez les végétaux, même si le débat est loin d'être clos.

3. Transduction du signal intracellulaire

En aval de la perception de l'agent pathogène ou de l'éliciteur *via* un récepteur potentiel, se mettent en place des étapes de signalisation intracellulaire extrêmement complexes (Figure 9). Cette cascade de transduction du signal conduisant à la RH est associée à des modifications biochimiques, cellulaires et moléculaires, et fait intervenir, entre-autres, des protéines G (GTP- binding protein), des flux ioniques, des cascades de phosphorylation / déphosphorylation, des

formes réactives d'oxygène (ROS) et le monoxyde d'azote (NO).

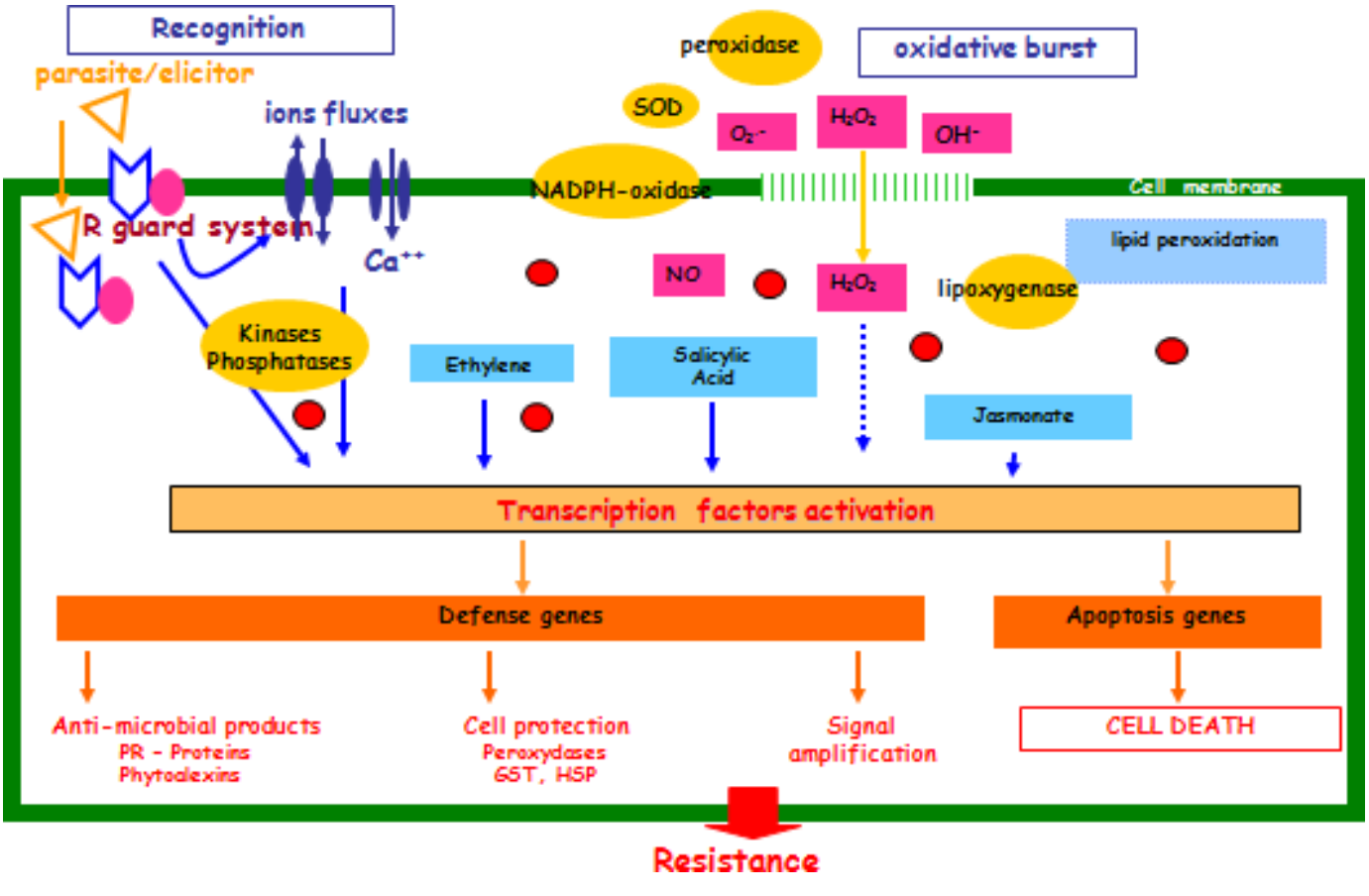


Figure 9 : Transduction du signal intracellulaire

3. 1. Les formes réactives de l'oxygène

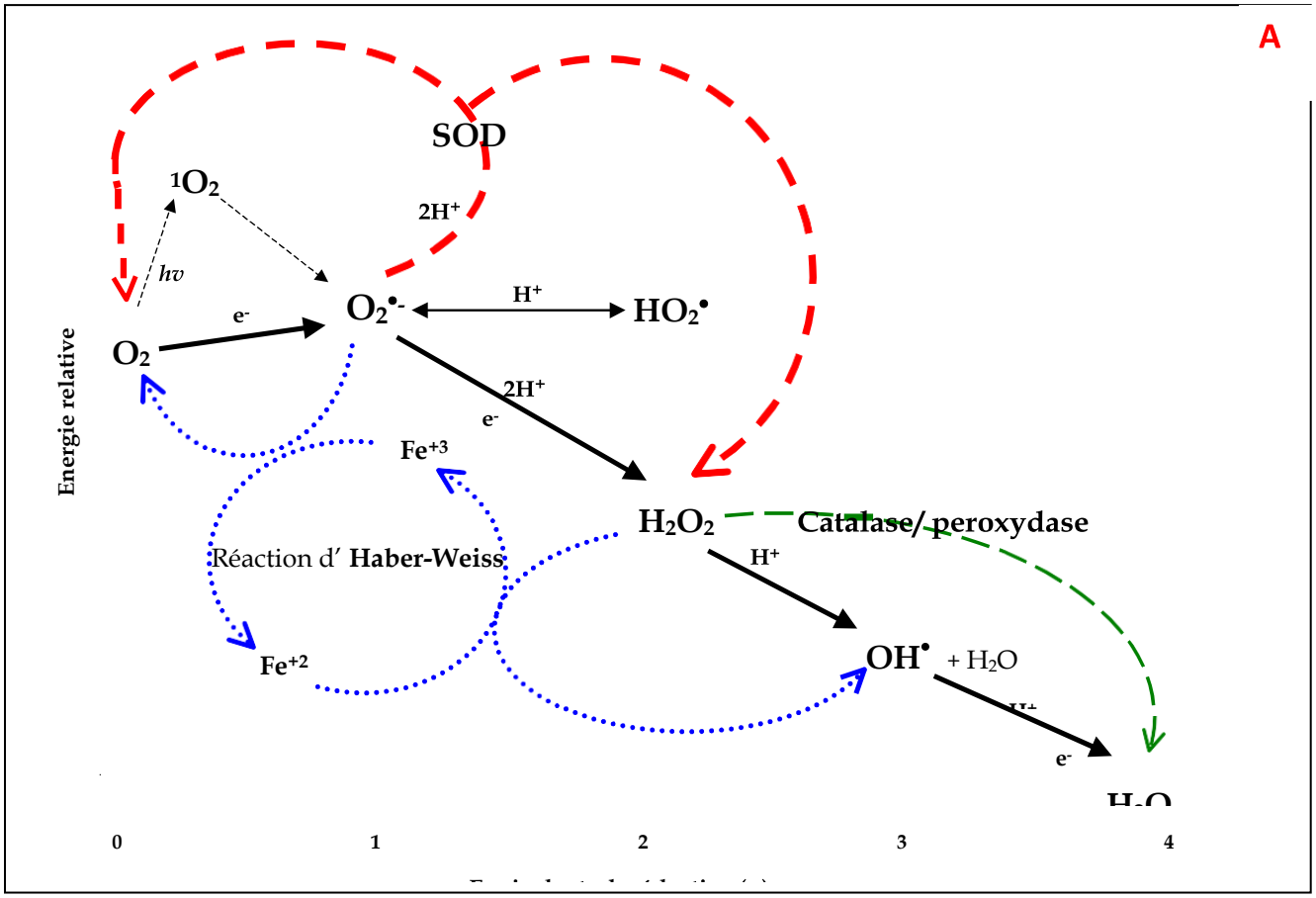
L'oxygène est à l'origine des ROS formées par sa réduction séquentielle. Ces ROS incluent principalement l'oxygène singulet ($^1O_2$), l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH°) (Figure 10). Dans la littérature, différents termes sont utilisés : Espèces Actives de l'oxygène (Active Oxygen Species, AOS), Espèces Réduites d'Oxygène (Reduced Oxygen Species, ROS) Intermédiaires Actifs d'Oxygène (Active Oxygen Intermediates, AOI), Oxygène Actif (Active Oxygen, AO), Intermédiaires Réactifs d'Oxygène (Reactive Oxygen Intermediates, ROI), ou encore Espèces Réactive d'Oxygène, (Reactive Oxygen Species, ROS). Toutes ces descriptions reflètent la complexité et les potentialités diverses de ces molécules. Pour désigner ces composés, nous utiliserons l'abréviation ROS ou le terme radicaux libres, bien qu'il ne s'agisse pas uniquement de radicaux du point de vue chimique. Les ROS sont produites en faible quantité au cours du métabolisme normal de tout organisme aérobie par le système de transport d'électrons tels les chloroplastes (photosynthèse) et les mitochondries (respiration) ou lors de processus enzymatiques. Elles sont utiles à l'organisme à doses modérées, mais toxiques à haute dose. L'organisme va alors se protéger par divers systèmes antioxydants enzymatiques (SOD, catalase, peroxydase, glutation transférase) ou non enzymatiques en produisant de l'acide ascorbique et/ou du glutation. Dans ce sens, le rôle des glucosyltransférases a été récemment étudié. L'équilibre entre la production et l'élimination des ROS constitue le stress oxydant, très largement documenté dans les interactions plantes /pathogènes. Dans certaines circonstances particulières, ces formes très réactives s'accumulent et peuvent être à l'origine de nombreux évènements qui aboutissent à l'altération de l'architecture cellulaire, voire à la mort. Cet aspect néfaste fait cependant trop souvent oublier le rôle joué par les ROS dans la signalisation cellulaire.

3.2. La réduction séquentielle de l'oxygène et les systèmes impliqués dans la production des ROS

L'oxygène représente aujourd'hui 21% de l'atmosphère terrestre. Les végétaux chlorophylliens, terrestres ou aquatiques, assurent sa production à partir de la molécule d'eau, tous les organismes vivants utilisent cet oxygène dans un processus de production d'énergie au cours de la respiration. En effet, la formation de molécules hautement énergétiques comme l'ATP est fortement liée à une chaîne de transporteurs qui transfère des électrons de molécules biologiques réduites vers un accepteur final : l'oxygène. Pourtant, une réduction incomplète de l'oxygène moléculaire est possible L'oxygène moléculaire est relativement non toxique et non réactif, sa réduction séquentielle mono-électronique conduit à la formation des ROS (Figure 10).

Les ROS, ou les radicaux libres, sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possède un électron célibataire (ou non apparié). Le champ magnétique créé par sa rotation n'est donc pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules produisant de nouveaux radicaux libres de type peroxydasique extrêmement réactifs.

Le radical hydroxyle est généré par une réaction non enzymatique, la réaction de Haber-Weiss, qui fait intervenir des métaux de transition tels que le Fe^{2+}, Cu^{+}. Les ROS sont produits par un grand nombre de mécanismes programmés par l'organisme à des fins de défense ou de signalisation.



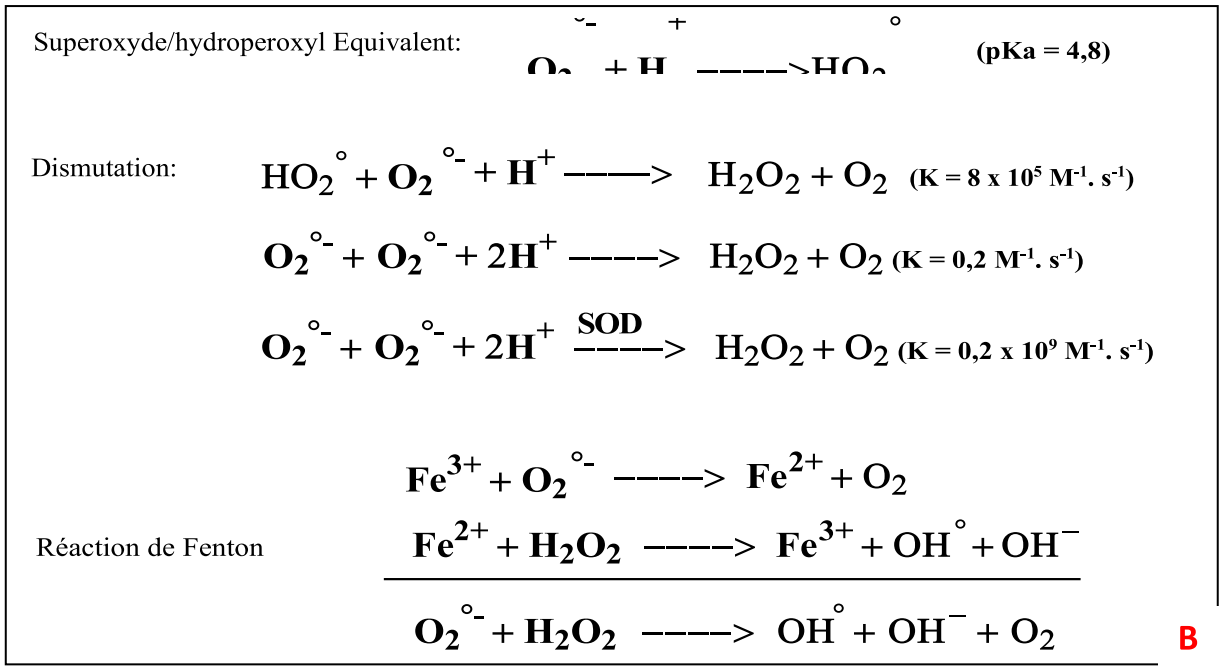


Figure 10 : Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (d'après Baker et Orlandi, 1995).
A : Réactions d'interconversion.

B : Equations chimiques associées aux ROS.

La production des ROS a été mise en évidence pour la première fois par Doke (1983a,b) lors de la RH sur des tissus de tubercule de pomme de terre infectés par une race incompatible de *P. infestans.* Depuis, de nombreuses études ont montré que les ROS sont induites par des agents pathogènes ainsi que par des éliciteurs de toute nature. L'évolution de la cinétique de production de ROS après la mise en contact de cellules végétales avec un microorganisme pathogène est différente selon qu'il s'agisse d'une interaction compatible ou incompatible.

Dans le cas de l'interaction compatible, une production transitoire de ROS peut avoir lieu quelques minutes après le contact des deux partenaires (appelée phase I) suivie d'une baisse irréversible. Dans le cas de l'interaction incompatible, deux phases ont été observées : une première phase identique à celle de l'interaction compatible est suivie quelques heures plus tard d'une deuxième phase de production de ROS (appelée phase II). La deuxième phase est caractéristique des situations incompatibles, elle coïncide avec un phénomène d'échange d'ions à travers la membrane cytoplasmique notamment un efflux d'ions K^+ et un influx d'ions H^+ et conduit à la mort cellulaire quelques heures plus tard . La phase I de production de ROS est non spécifique. Par contre, la phase II nécessite l'action des gènes *hrp* dans la résistance non-hôte et l'action des gènes *Avr* dans la résistance spécifique race/cultivar.

Dans des suspensions cellulaires de tomate infectées par *Ps. syringae* pv. *tomato,* la phase II de production de ROS est induite uniquement lorsque *Pto* et *AvrPto* sont présents dans les organismes correspondants. La phase II du burst oxydatif semble donc reliée au phénomène de résistance.

Plusieurs enzymes sont aptes à générer les ROS au cours des interactions plantes/pathogènes soit en tant qu'intermédiaire dans une suite de réactions, soit en tant que produit final de réactions contrôlées par les NAD(P)H-oxydases, glucose oxydases,

oxalate oxydases ou certaines peroxydases. Au cours des dernières années, de nombreux travaux ont montré l'activation du complexe de la NAD(P)H oxydase capable d'utiliser de l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'$O_2^{\circ -}$ au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules végétales. Sur différents modèles, des protéines végétales sont reconnues par des anticorps dirigés soit contre des sous-unités régulatrices du complexe oxydase des neutrophiles humains comme $p47^{phox}$ (phox pour le terme de « phagocyte oxydase »), $p67^{phox}$ ou une petite protéine G (Rac 2) (Kieffer *et al.*, 1997), soit contre une sous-unité constitutive de ce complexe ($p22^{phox}$).

Les gènes codant pour des homologues à la sous-unité $gp91^{phox}$ de NADPH oxydases de mammifères ont maintenant été clonés chez le riz et *Arabidopsis*. Ces résultats, ajoutés aux parentés immunologiques entre les systèmes d'oxydases dans les neutrophiles et les cellules de plantes, suggèrent une similarité entre les mammifères et les plantes dans les processus de défense contre les microorganismes pathogènes. L'inhibition de l'activité des NAD(P)H oxydases par un inhibiteur suicide des NAD(P)H oxydases de mammifères comme le (DPI) empêche la production des ROS après élicitation dans plusieurs systèmes végétaux.

Les ROS sont aussi produites par des peroxydases pariétales. Ainsi, des cotylédons de cotonniers infectés par une race incompatible de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*) génèrent un burst oxydatif extracellulaire grâce à une NADH peroxydase cationique apoplastique. Cette observation est confortée par le fait qu'un gène de peroxydase de cotonnier, *GhPod4,* présente une transcription précoce et plus importante dans le cas c'une interaction incompatible. Cependant, sur des cellules de haricot, une partie de la production de H_2O_2 induite par un éliciteur issu de *Colletotrichum lindemuthianum* est inhibée par la présence de cyanure de potassium (KCN) alors que les NADPH oxydases sont insensibles à ce composé.

Sur le même matériel végétal, il a été mis en évidence une peroxydase cationique de 46 KDa localisée dans la paroi des cellules capables de produire H_2O_2 . Il faut également signaler qu'il existe d'autres systèmes de production des ROS comme chez l'orge où une oxalate oxydase est responsable de la production de H_2O_2. Enfin, une lipoxygénase a aussi été proposée comme producteur des ROS (Roy *et al.*, 1994), mais il a été récemment mis en évidence que l'activation de cette enzyme est postérieure à la production des ROS.

4. Transduction du signal intercellulaire

L'un des évènements liés à la réaction hypersensible est la production de molécules qui serviraient de signaux pour activer les défenses des cellules voisines ou distantes de la zone d'infection. Cette notion de transduction du signal intercellulaire repose pour beaucoup sur des molécules « signal » comme les hormones tels l'acide salicylique (SA), l'éthylène, l'acide abscissique (ABA) ou l'acide jasmonique (JA) (Figure 11). Dans le cas de la LAR (Local Acquired Resistance) et de la SAR (Systemic Acquired Resistance), le SA est un élément cléf de leur installation. Il a été proposé que les tissus concernés par la LAR pourraient être la zone de production des signaux nécessaires à l'établissement de la SAR. Le JA, un octadécanoide de la famille des oxylipines, joue également un rôle déterminant dans la résistance des plantes aux parasites.

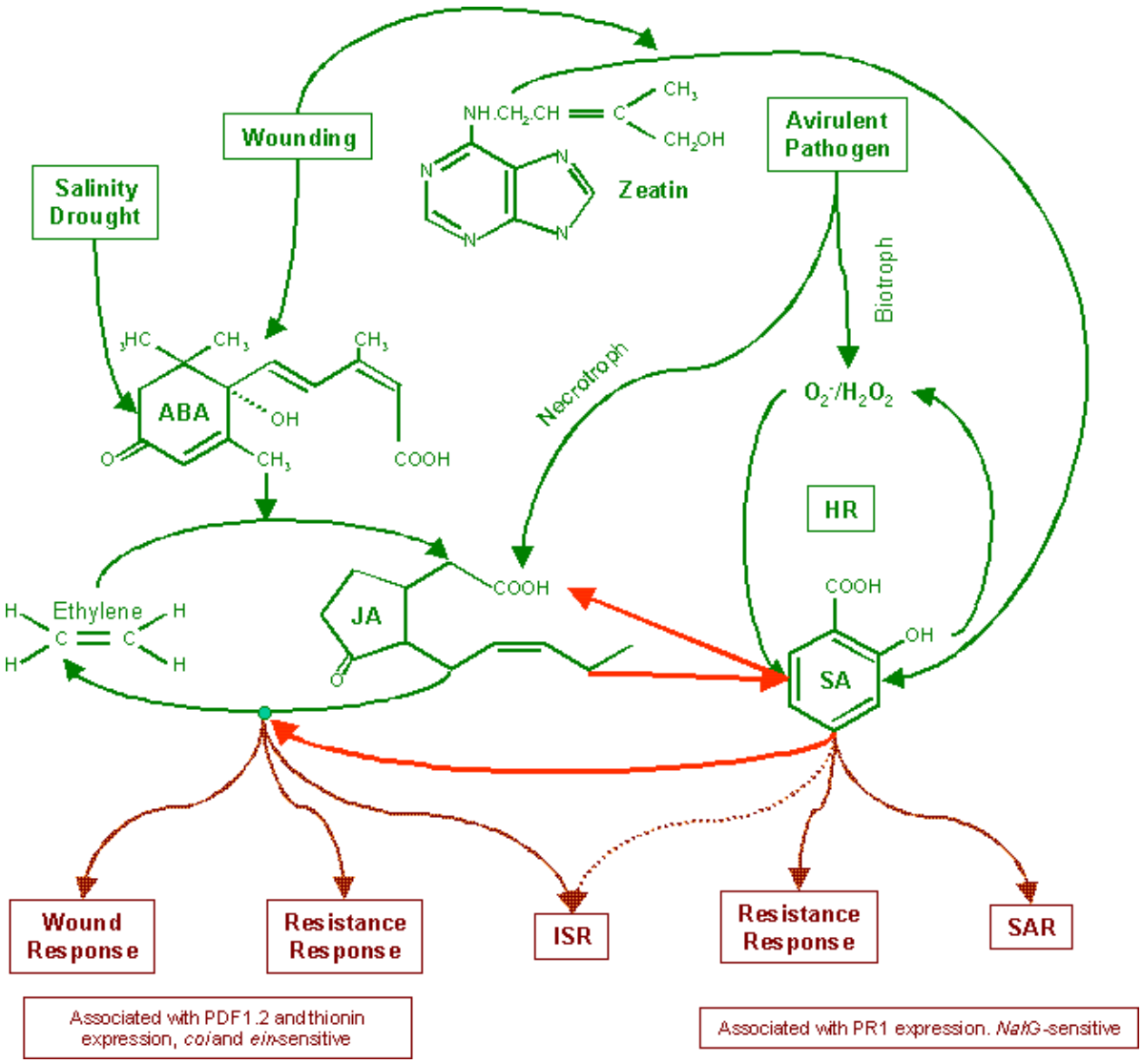


Figure 11 : Transduction du signal intercellulaire
Les hormones (AJ, AS, ET, et ABA) impliquées dans la régulation
des processus liés à des stress biotiques et abiotiques

4.1. L'acide jasmonique

Cet acide 12-oxo phytodiénoique est un dérivé cyclique produit à partir de 13-(*S*)-hydroperoxyde de l'acide linolénique (C18 :3) par l'action séquentielle de nombreuses enzymes. Ainsi, le 13 (*S*) hydroperoxyde lipidique produit à partir d'une activité 13-LOX est cyclisé avant de subir trois étapes de □-oxydation pour diminuer la longueur de sa chaîne carbonée. Cette synthèse est analogue à celle observée chez l'animal, lors de la

production des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (C20 :4). L'AJ est le produit final d'une des voies de synthèse des oxylipines, la voie des octadécanoïdes (Figure 12).

L'AJ et son ester méthylé, le MeJA, une molécule volatile, ne sont pas seulement impliqués dans la croissance et le développement de la plante mais également dans la signalisation aboutissant à des réponses de défense. Il a été montré que l'AJ s'accumule précocement au site d'infection du VMT chez le tabac, après blessures chez le tomate ou après traitement des cultures cellulaires de soja et de tabac avec des éliciteurs. L'AJ et le MeJA interviennent dans l'expression locale et systémique d'inhibiteurs de protéases dans les feuilles de tomates en réponse à la blessure. De plus, l'addition exogène de l'acide jasmonique se traduit par l'activation des gènes codant pour la PAL, la CHS chez des cultures cellulaires de soja et de tabac, la production de peptides ou protéines antifongiques défensines chez *Arabidopsis* , l'expression d'une osmotine (PR-5) chez le tabac, la stimulation de LOX dans plusieurs systèmes végétaux ou la production de H_2O_2 chez la tomate *via* d'une activité NADPH-oxydase.

Des mutants d'*Arabidopsis* qui ne pouvent pas accumuler l'AJ sont extrêmement sensibles à l'infection par un *Pythium*. L'application exogène d'AJ permet de réduire significativement cette sensibilité. L'AJ semble donc directement impliqué dans ce cas de défense chez *Arabidopsis*. Le pré-traitement des plants de pomme de terre par l'AJ augmente leur résistance vis-à-vis de *P. infestans*. Récemment, une autre approche confirmant l'importance de l'AJ dans la résistance a consisté à produire l'AJ de manière constitutive chez *Arabidopsis*. Ces plantes transgéniques présentent une résistance très efficace à des souches de mildiou. Le rôle de l'AJ et du MeJA comme molécule signal dans la défense semble toutefois dépendre de l'espèce végétale et de la nature des réponses étudiées. Par exemple, chez le riz, l'AJ ne semble pas nécessaire pour l'induction de

gènes de protéines PR et l'établissement d'une résistance locale. De plus, des tabacs transgéniques n'exprimant pas la WIP kinase n'accumulent pas d'AJ après blessures, alors qu'une surexpression de cette kinase induit une augmentation du taux endogène d'AJ. Ceci suggère qu'un mécanisme de phosphorylation est également impliqué dans la voie de signalisation de l'AJ lors de la blessure.

Un modèle impliquant l'AJ et le MeJA dans les réponses à l'attaque par des insectes et des agents pathogènes a été proposé. La blessure provoquée par un insecte herbivore ou l'infection par un micro-organisme conduirait à la production de molécules spécifiques, telles que la systémine ou des oligogalacturonides pariétaux qui activeraient une lipase. Cette lipase libérerait de la membrane plasmique de l'acide linolénique qui serait converti en AJ via des LOX. L'AJ stimulerait ensuite l'expression des gènes de défense. Des phospholipases sont effectivement activées après élicitation de suspensions cellulaires de soja ou de tabac, et après blessures chez *Arabidopsis*. Une enzyme avec une activité phospholipase A2 a été isolée chez le tabac infecté par le VMT. Une forte stimulation de cette activité phospholipase précède une augmentation des quantités d'AJ. Chez *Arabidopsis* un gène codant pour une JMT (*S*-adenosyl-L- methionine : jasmonic acid carboxyl methyltransferase, enzyme qui catalyse la transformation de l'AJ en MeJA) a été isolé. Cette étude montre, en utilisant des plants transgéniques d'*Arabidopsis* surproduisant du MeJA, que la *JMT* joue un rôle essentiel dans la régulation des réponses spécifiques aux microorganismes. Ces plantes montrent une résistance très efficace vis-à-vis des souches virulentes de *B. cinerea.* Ce travail suggère que l'activation de l'expression de *JMT* conduit à la production de MeJA qui réagit comme régulateur intra- et inter- cellulaire, et comme messager volatile assurant la communication intra- et inter-plantes.

Le développement de mutants *coi (coronative insensitive1)* chez *Arabidopsis*, qui présentent des déficiences de certains mécanismes jasmonate-dépendants, *jar1 (jasmonate*

resistant 1) et *jin1 (jasmonate insensitive1)* a permis de lever un voile partiel sur la complexité de la voie de l'AJ. Les récepteurs cellulaires de l'AJ et de ses dérivés sont en fait très diversifiés traduisant le potentiel de réponse des plantes à différents stimuli endogènes ou exogènes. La voie de signalisation de l'AJ se distingue aussi par son aptitude à s'autoréguler ; les gènes de la voie de biosynthèse de l'AJ peuvent ainsi être activés par les JAs, suggérant un rétrocontrôle positif impliquant, entre autres, les canaux calciques. Malgré les progrès récents quant à la fonction de l'AJ dans la résistance des plantes aux agressions parasitaires, la connaissance des fondements moléculaires des mécanismes de régulation que contrôle cette molécule demeure encore très fragmentaire et constitue un terrain d'investigations très fertile.

Dans cette optique, l'analyse des mutants *jaz (jasmonate ZIM domain :* domaines codant des protéines qui répriment l'expression des gènes sensibles à l'AJ) permettra d'améliorer la compréhension du rôle de l'AJ.

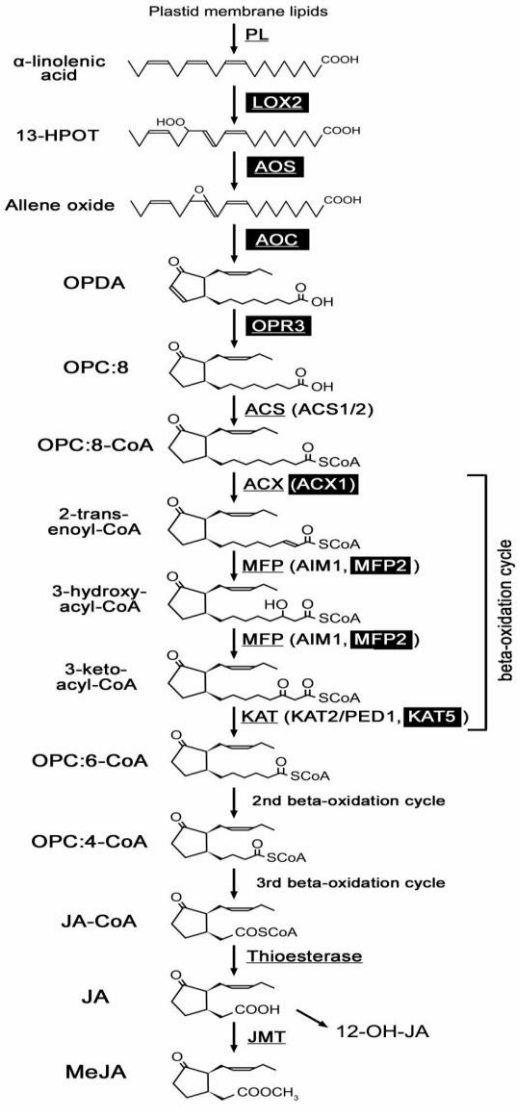


Figure 12: **Représentation schématique de la voie des octadécanoides conduisant à la synthèsede l'AJ.** L'expression des gènes codant les enzymes surlignées en noir sont régulées par l'AJ chez *Arabidopsis*.

4.2. Interconnexion des différentes voies de signalisation

Dans son écosystème de prédilection, une plante est sujette à des contraintes biotiques et abiotiques simultanées. Soumise à des attaques multiples, elle devra actionner l'ensemble des leviers à sa disposition pour optimiser ses stratégies de défense à un moindre coût en favorisant la communication entre les voies hormonales (crosstalk) (Figure 13).

Les approches pharmacologiques et l'utilisation des différents mutants ont révélé la multiplicité et la diversité des interconnections entre les voies de transduction du signal, traduisant les capacités adaptatives puissantes de la plante à un environnement hostile.

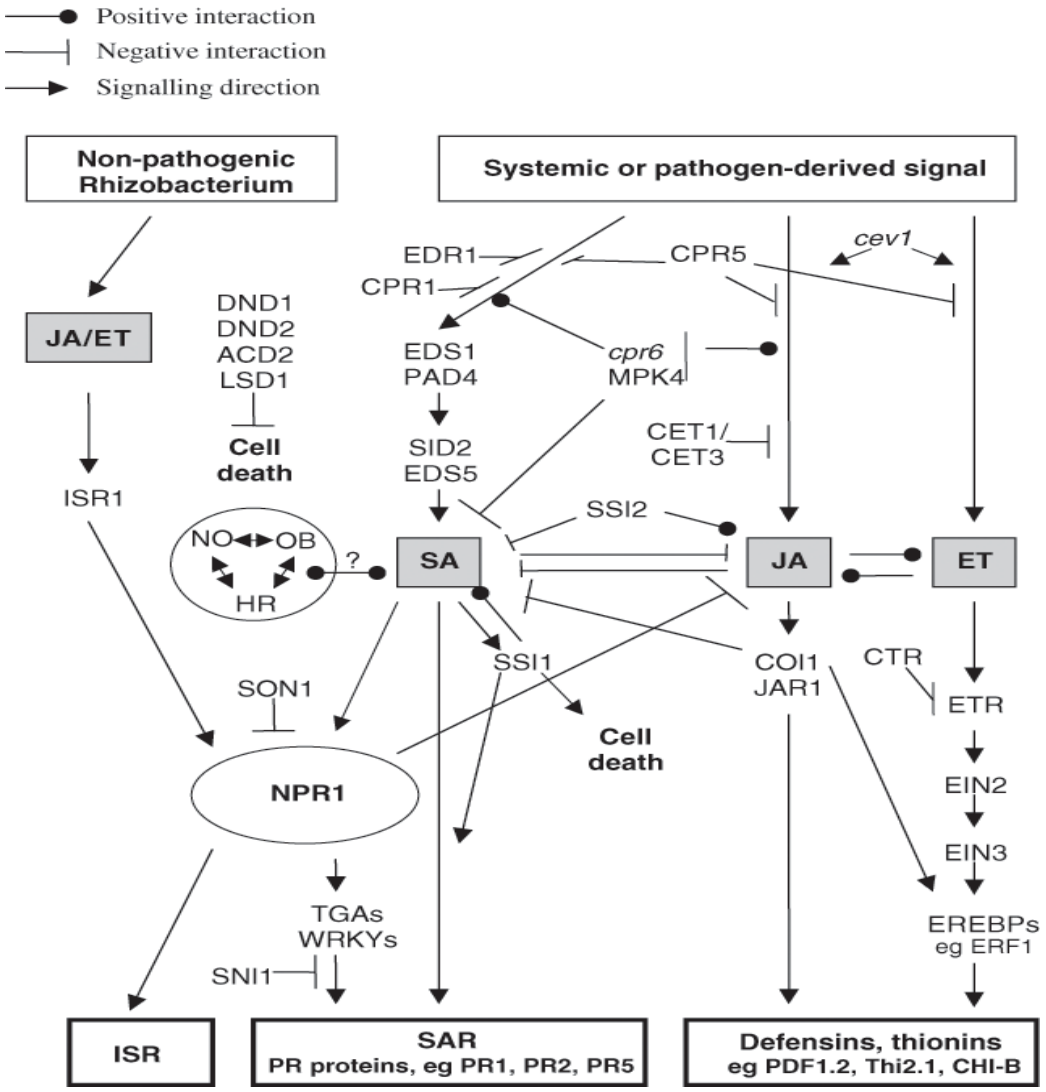


Figure 13 : Interactions hormonales suite à un stress biotique ou infection par une bactérie non pathogène

4.2.1. Phénomène de potentialisation

Le phénomène de potentialisation est un exemple de coopération dans les systèmes de signalisation impliqués dans la réposne aux stress biotiques et abiotiques. Il y a potentialisation lorsqu'un ou plusieurs signaux affectent positivement (en cinétique et en magnitude) l'expression de réponses de défense induite par un signal primaire. Par exemple, l'éthylène potentialise l'induction par l'AS de l'expression du gène PR-1 chez *Arabidopsis*.

De nombreux travaux ont montré que l'AS lui-même joue un rôle dans la pontentialisation de réponses de défense après élicitation. Chez le soja, de très faibles concentrations en AS stimulent l'expression de gènes de défense (PAL et gluthation-S-transférase), l'accumulation de H_2O_2 et la mort cellulaire après infection par la bactérie avirulente *Ps. syringae* pv. *glycinea* . Ces concentrations en AS sont cependant trop faibles pour induire seules ces réponses de défense. Chez le persil, l'AS à faible concentration aurait un rôle dans la potentialisation de certaines réponses de défense et dans l'induction directe d'autres gènes de défense comme certaines peroxydases. Toujours chez le persil, des effets du BTH seraient très similaires.

4.2.2. Relations entre l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'éthylène et l'acide abscissique

Il apparaît clairement aujourd'hui que les voies de signalisation peuvent être inter-reliées. Une analyse en microarray a cependant révélé que ces hormones ont peu de gènes cibles en commun, du moins au cours de la croissance chez Arabidopsis. Dans certains cas, les signaux agissent par antagonisme ou synergisme. Par exemple, l'AS bloque la biosynthèse de l'AJ chez la tomate ou contrôle négativement l'expression de gènes régulés par l'AJ et par l'éthylène. Inversement, il peut y avoir également inhibition de l'action

d'AS par l'AJ. Dans d'autres cas, les signaux agissent en synergie pour activer des réponses de défense. Par exemple, dans des plantules de tabac, l'induction de l'expression des gènes PR-1 et PR-5 est plus importante lorsque du MeJA et de l'éthylène sont appliqués en combinaison.

Dans certains pathosystèmes, le contrôle négatif de la voie de l'AJ passe par celle de l'AS *via* la protéine NPR1 cytosolique ; une mutation du gène *NPR1*va activer la voie de l'AJ qui contrôle ses propres gènes de synthèse. En revanche, lors d'une attaque d'herbivore, NPR1 va inhiber la voie de l'AS pour permettre l'activation de celle de l'AJ et stimuler les réactions de défenses spécifiques de ce traumatisme mécanique. NRP1 est donc une protéine majeure dans la communication entre les voies de l'AS et de l'AJ, tout particulièrement pour son adaptation à la biologie du parasite (biotrophe *versus* nécrotrophe). Les mutants *coi1* d'*Arabidopsis* sont altérés dans l'induction de certains mécanismes liés à l'AJ mais surexpriment ceux dépendants de l'AS, avec une meilleure résistance aux souches virulentes de *Pseudomonas syringae*.

Chez *Arabidopsis*, l'expression d'une défensine nécessite à la fois l'action de l'éthylène et de l'AJ, mais est indépendante d'AS.

On distingue ainsi des sous-groupes de gènes qui sont induits au cours d'une interaction plante /agent pathogène mais ne sont pas régulés par les mêmes signaux. Ainsi, lors de l'interaction entre le tabac et le VMT, il y a au niveau de la feuille supérieure une induction indépendante d'AS de l'expression de certains gènes de défense SIS (SA-Independent, **S**ystemically induced genes) au sein desquels l'induction de certains est régulée indépendamment de l'éthylène. Lors de l'infection d'*A. thaliana* par *Erwinia. carotovora*, l'expression de certains gènes est contrôlée par l'AJ et l'éthylène, alors que d'autres sont régulés par l'AJ.

Dans cette interaction, l'AS ne semble pas jouer un rôle majeur bien qu'il puisse

induire de manière synergique les gènes contrôlés par l'AJ et l'éthylène et réprimer les gènes régulés par l'AJ seul.

Les relations entre l'AS et l'ET sont par contre plus obscures ; des analyses de microarrays suggèrent une action potentialisatrice de l'ET sur l'induction du gène *PR1* dépendant de l'AS, alors qu'une approche génétique démontre l'inverse. Ces techniques ont également révélé un effet synergique entre les voies de l'AJ et celle de l'ET dans l'induction d'un nombre de gènes de défense dans plusieurs pathosystèmes, avec une action inductrice très forte pour l'ET. Chez le cotonnier infecté par *Xanthomonas*, la transcription du gène *GhLOX1* codant une 9-lipoxygénase est fortement induite par l'action combinée de ces deux hormones (Champion *et al.*, résultats non publiés).

Récemment apparu sur la scène de la résistance, l'ABA interagit également avec les autres voies de signalisation. Cette molécule semble affecter la synthèse d'AJ lors de l'activation des défenses contre le champignon *Pythium irregulare* en intervenant en amont de ce dernier. En effet, les voies de l'AJ et de l'ET sont stimulées dans des mutants déficients en ABA, alors qu'un traitement de plantes avec l'ABA exogène réduit la transcription de gènes dépendants de l'AJ et de l'ET. Ces auteurs ont également montré que chez *Arabidopsis*, le champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola* inhibe la synthèse d'ABA. Dans ce pathosystème, le gène de la callose synthase *pmr4*, sous contrôle de l'ABA, inhibe la voie de l'AS et permet ainsi à celle de l'AJ de contribuer la résistance à ce champignon. Un traitement par l'acide a-aminobutyrique, inducteur de résistance, mime l'effet de l'ABA en augmentant la résistance. Dans le mutant d'*Arabidopsis* affecté dans l'expression de *pmr4*, l'AS dont l'inhibition de la voie est ainsi levée régule négativement la voie de l'AJ pour déclencher le processus de sensibilité à ce parasite. Cet exemple illustre la complexité des relations entre l'AJ, l'AS et l'ABA et traduit l'imbroglio de la communication entre ces voies de signalisation dans lesquelles le

rôle des ROS n'est pas à sous-estimer.

CHAPITRE 5 LE STRESS OXYDATIF CHEZ LES VEGETAUX

Le stress oxydatif chez les plantes fait l'objet de très nombreuses revues bibliographiques et de plusieurs livres. Ainsi, le but de cette première partie bibliographique n'est pas de faire un point totalement exhaustif sur ce vaste sujet, mais de réaliser un aperçu des différents processus prooxydants et antioxydants se déroulant dans les cellules végétales, permettant de comprendre les mécanismes conduisant à la génération d'un stress oxydatif.

1 Le statut redox cellulaire

Commencée il y a plus de 1,8 milliards d'années, l'augmentation progressive de la teneur en dioxygène dans l'atmosphère terrestre a permis le développement du métabolisme
aérobie. L'apparition de ce métabolisme aérobie est une adaptation à une nouvelle contrainte
environnementale. Il possède également un avantage important par rapport aux métabolismes
anaérobies puisqu'il permet d'augmenter de façon très significative la quantité d'énergie (ATP) produite. L'évolution positive de l'efficience du mécanisme de production énergétique
a contribué au développement d'organismes multicellulaires complexes. Toutefois, le dioxygène n'est pas un gaz neutre, et sa réactivité conduit à la formation d'espèces réactives

de l'oxygènes pouvant réagir avec les composés biologiques et induire certains dommages.

1.1 Les Espèces Réactives de l'Oxygène

1.1.1 ERO ou radicaux libres ?

Les ERO sont souvent associées aux radicaux libres. Le terme de radical libre renvoie à n'importe quelle espèce capable d'une existence indépendante (d'où le terme de libre) contenant un ou plusieurs électrons non appariés. Un électron non apparié est un électron qui occupe seul, une orbitale atomique ou moléculaire. L'exemple le plus simple de radical libre est l'hydrogène qui possède un seul électron non apparié sur sa couche orbitale externe. Ainsi, si les radicaux libres ne sont pas forcément associés à des espèces dérivant de l'oxygène, la notion de réactivité n'est pas forcément relative aux radicaux. Les ERO désignent à la fois des espèces radicalaires de l'oxygène (O2, O2.-) et des espèces non radicalaires ($O_2$2-, $1O_2$; Figure 1). Ainsi, tous les radicaux oxygénés sont des ERO, mais tous les ERO ne sont pas des radicaux.

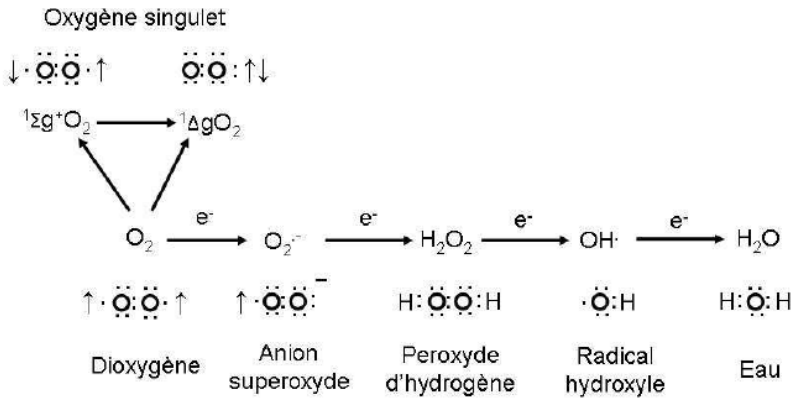


Figure 2 : Schématisation de la transformation énergétique ou chimique (réductions successives) de la molécule de dioxygène dans un système biologique.

La forme stable de dioxygène que nous connaissons, dite triplet, est un biradical libre possédant deux électrons non appariés avec des spins parallèles. Sous cette forme, le dioxygène est un puissant agent oxydant. Cependant, en vertu des règles de restriction de spin

de Wigner, et du fait de sa structure électronique, l'oxygène fondamental possède une forte inertie vis-à-vis des molécules biologiques, pour la plupart non radicalaires. Sa réactivité est

limitée aux molécules capables d'apporter un ou deux électrons non appariés, et dont le spin

est antiparallèle aux siens.

La réactivité des espèces chimiques qui dérivent de ce dioxygène est, elle aussi, relative. En effet, l'anion superoxyde (O2**.**-) et le peroxyde d'hydrogène (H2O2) sont très sélectifs dans leurs réactions avec les molécules biologiques et ne vont, par exemple, interagir qu'avec

quelques enzymes. Au contraire, le radical hydroxyle (**.**OH) réagit avec toutes les molécules

présentes à proximité

Les différents types d'ERO

1.1.2.1 Les ERO primaires

Différents types d'ERO, plus réactifs que l'O2, peuvent être formés dans les organismes vivants. Certaines, directement dérivées de la molécule de dioxygène, sont appelées ERO primaires. Dans un premier temps, un apport énergétique réorganise les électrons de la molécule de dioxygène pour former une des deux formes du dioxygène singulet Figure 1). Cependant, l'état singulet 1Σg+O2 est très instable et se transforme

rapidement en 1_gO2 (Figure 2). Cette dernière forme singulet qui peut se retrouver dans les tissus biologiques, est plus communément écrite sous la forme 1O2. Le passage à la forme singulet enlève la contrainte de restriction de spin, et 1O2 peut réagir directement avec les composants cellulaires. La réactivité du dioxygène singulet étant très importante, sa concentration cellulaire peut être considérée comme négligeable.

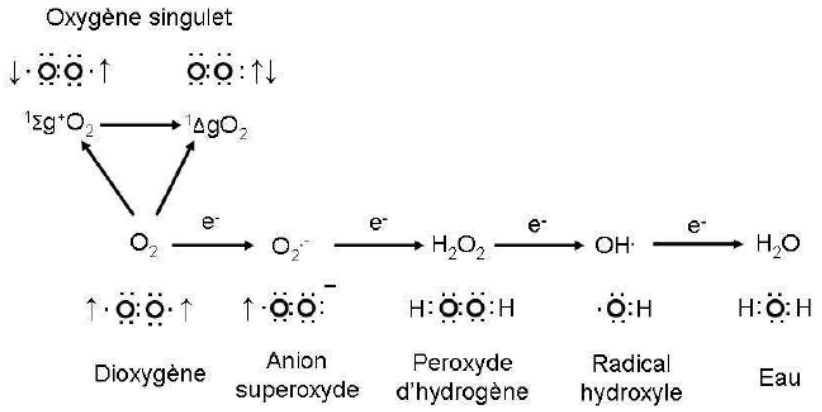


Figure 2 : Schématisation de la transformation énergétique ou chimique (réductions successives) de la molécule de dioxygène dans un système biologique.

Au cours de divers processus physiologiques, un électron peut également être transféré au dioxygène, ce qui conduit à la formation de l'anion radical superoxyde O2.- (Figure 1 et Figure 2). Le potentiel redox du couple O2 .-/ H2O2 est de + 0,94 V (Foyer and Noctor, 2005b).

Sa réactivité est limitée et spécifique à certaines molécules biologiques comme les ènes et diènes, certains acides aminés comme le tryptophane, l'histidine ou la méthionine ou les lipides, avec qui il peut former des hydroperoxydes. L'anion superoxyde possède une demi-vie courte, d'environ 2 à 4 µs, et ne peut pas réellement diffuser dans la cellule. Sa concentration cellulaire est inférieure à 1 nM.

L'addition d'un nouvel électron au radical superoxyde permet de former l'ion peroxyde (O22-) avec un affaiblissement de la liaison O-O. Dans les systèmes biologiques, les réactions ne s'enchaînent pas de la même manière, et la réduction de l'O_2 par deux

électrons ou la réduction d'O_2.- conduit à la formation d'H2O2 plutôt que d'O2 2- (Figure 2). Le potentiel redox du couple H2O2/.OH est de + 0,54 V. La réactivité du peroxyde d'hydrogène est faible et due essentiellement à sa capacité à oxyder les groupements thiols (-SH). Cette molécule relativement stable possède une durée de vie d'environ 1 ms, permettant une diffusion sur une certaine distance à partir du site de production. La concentration moyenne intracellulaire en H2O2 est de l'ordre de 0,5 µM mais peut varier de 0,1 à 100 µM. L'addition de deux nouveaux électrons élimine la liaison O-O et conduit à la formation de deux ions oxydes (O2-). De la même manière, dans les systèmes biologiques, la réduction de l'O2 par quatre électrons ou celle de l'H2O2 par deux électrons conduit à la formation d'eau (Figure 2).

Compte-tenu de leurs relatives faibles réactivités, la toxicité de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène est essentiellement due à leur capacité à générer une autre ERO, le radical hydroxyle (Figure 2). Toutefois, cette génération est catalysée par la présence de métaux de transition comme le cuivre ou le fer. Dans un premier temps, O2.- réduit un ion métallique qui va, par la suite, pouvoir être oxydé par H2O2, via la réaction de Fenton (Figure 3). La somme de ces deux réactions, appelée réaction d'Haber-Weiss, aboutit à la formation d'.OH.

Réaction de Fenton	$M^{n+} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + {}^{\bullet}OH + M^{(n+1)+}$
Réduction par le Superoxyde	$O_2^- + M^{(n+1)+} \rightarrow O_2 + M^{n+}$
Réaction de Haber-Weiss	$O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH^- + {}^{\bullet}OH + O_2$

Figure 3 : Réaction d'Haber-Weiss conduisant à la formation du radical hydroxyle.

M correspond à un métal de transition (essentiellement le cuivre et le fer).

Si les auteurs ne s'accordent pas sur le temps de demi-vie de ce radical hydroxyle (<1 µs à <1 ns), tous s'entendent sur son extrême réactivité et son très fort pouvoir oxydant (E .OH/H2O = + 2,20V). Il interagit fortement et très rapidement avec toutes les molécules biologiques. Ainsi, sa concentration cellulaire est considérée comme négligeable.

1.1.2.2 Les ERO secondaires

Les ERO secondaires correspondent aux ERO formées par réactions entre les ERO primaires et les composés biochimiques de la cellule. Le Tableau 1 présente quelques ERO secondaires. Contrairement aux ERO primaires, produites de façon régulière et en quantité importante par les cellules végétales, les ERO secondaires sont seulement formées dans des conditions particulières. Mis à part certains peroxydes organiques, très peu d'études se sont intéressées à ces ERO, et leur importance biologique est discutable.

Les Espèces Réactives de l'Azote (ERA) sont également présentées dans ce Tableau 1. Ces espèces particulières, possédant à la fois des capacités oxydantes et nitrifiantes, devraient

plutôt être dénommées Espèces Réactives de l'Oxygène et de l'Azote.

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
ERO :	**ERO :**
Carbonate, $CO_3^{\cdot-}$	Acide hypobromeux, HOBr
Peroxyl, $RO_2^{\cdot}$	Acide hypochloreux, HOCl
Alkoxyl, $RO^{\cdot}$	Peroxydes organiques, ROOH
Radical dioxyde de carbone, $CO_2^{\cdot-}$	Peroxynitrite, $ONOO^-$
	Peroxynitrate, O_2NOO^-
	Acide peroxynitreux, ONOOH
	Peroxomonocarbonate, $HCOOCO_2^-$
ERA :	**ERA :**
Oxyde nitrique, $^{\cdot}NO$	Acide nitrique, HNO_2
Dioxyde nitrique, $^{\cdot}NO_2$	Cation et anion nitrosyle, NO^+ et NO^-
Radical nitrate, $^{\cdot}NO_3$	Tétraoxyde et trioxyde d'azote, N_2O_4 et N_2O_3
	Peroxynitrite, $ONOO^-$
	Peroxynitrate, O_2NOO^-
	Acide peroxynitreux, ONOOH
	Cation nitronium, NO_2^+
	Chlorure de nitrile, NO_2Cl

Tableau 1 : Présentation de quelques espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) radicalaires ou non (adapté d'après Halliwell, 2006).

Ces dix dernières années, le rôle physiologique de l'oxyde nitrique (NO) a été particulièrement étudié chez les plantes. Il apparaît que le NO joue un rôle essentiel en tant que molécule de signalisation. L'oxyde nitrique peut également interagir avec O2

.- pour former du peroxynitrite :**.**NO + O2**.**-→ ONOOONOOA un pH physiologique, le peroxynitrite se protone rapidement pour former de l'acide peroxynitreux. Ce puissant agent nitrifiant et oxydant peut altérer directement de nombreuses

molécules biologiques. Il peut également générer des dommages indirects en subissant une fission homolytique produisant deux puissants agents oxydants, le dioxyde nitrique et le radical hydroxyle:

ONOOH → **.**NO2 + **.**OH

Ainsi, les voies de production d'ERO et d'ERA primaires sont fortement interconnectées. C'est pour cette raison qu'une partie des ERA est considérée comme des ERO par certains auteurs (Tableau 1). Néanmoins, la quantité d'**.**OH provenant de cette voie, ainsi que la quantité d'ERA produite, est faible dans les tissus végétaux. En effet, la quantité de **.**NO générée est de l'ordre de quelques nmol.g-1.h-1, alors que la quantité d'O2

.- produite est de l'ordre de plusieurs centaines de µM.s-1; la teneur moyenne des cellules végétales en H2O2 est de l'ordre de plusieurs micromolaires. Pour cette raison, la suite de cette revue bibliographique sera uniquement consacrée aux ERO primaires.

1.2 Potentiel redox intracellulaire

Les organismes aérobies les plus évolués ont dû développer des systèmes de conduction des nutriments mais également de l'oxygène, pour s'assurer de sa distribution dans l'ensemble de l'organisme (systèmes vasculaires). Posséder de tels systèmes de

distribution est un avantage, car ils permettent de réguler les flux de dioxygène parvenant aux cellules. Cependant, les systèmes de régulation n'empêchent pas la production d'ERO au niveau cellulaire. La quantité d'H2O2 produite est assez importante, conduisant à une concentration moyenne de l'ordre du micromolaire. Cette concentration non négligeable de molécules oxydantes a conduit à des adaptations au niveau cellulaire. Toutes les cellules d'organismes aérobies contiennent des concentrations importantes de molécules possédant un fort pouvoir réducteur, comme les couples GSH/GSSG (glutathion réduit/glutathion oxydé), NAD(P)/NAD(P)H (nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydé/réduit), TRXox/TRXred (thiorédoxine oxydée/réduite) et Fdox/Fdred (ferrédoxine oxydée/réduite) (Tableau 2). Contrairement aux cellules animales, les cellules végétales, et en particulier les cellules chlorophylliennes, contiennent de très grandes quantités d'ascorbate (Déhydroascorbate/Ascorbate).

Couple redox	Potentiel redox (V)	Gamme de concentration cellulaire (µM)
DHA/ASC	- 0,10	10000-20000
GSSG/GSH	- 0,24	2000-5000
NAD(P)/NAD(P)H	- 0,32	200-500
TRX_{ox}/TRX_{red}	- 0,33	10-100
Fd_{ox}/Fd_{red}	- 0,42	10-100

Tableau 2 : Valeur des potentiels redox et gamme de concentration des principaux couples redox rencontrés dans les cellules végétales (adapté d'après Foyer and Noctor, 2005b).

Le potentiel redox intracellulaire, ou statut redox, est la résultante de l'état redox des couples oxydo-réducteurs présents dans la cellule. Cette notion peut s'apparenter à la notion de pH cellulaire associée aux couples acido-basiques. En pratique, les conditions

redox régnant dans la cellule sont évaluées par le rapport des concentrations des formes oxydées et réduites des couples redox prépondérants, comme ceux du glutathion et de l'ascorbate (Noctor, 2006). Du fait de leurs fortes concentrations cellulaires, les deux couples GSSG/GSH et DHA/ASC agissent comme des tampons redox, à l'instar des tampons acidobasiques.

Il existe une très forte interconnexion entre les ERO et les molécules réductrices. Par

exemple, le GSH et l'ascorbate sont capables de réduire directement l'anion superoxyde et le

peroxyde d'hydrogène. Ils servent également de co-substrats aux enzymes antioxydantes détoxiquant les ERO. Ainsi, de part leur potentiel oxydant et via leurs interactions avec les couples redox majoritaires, les ERO contribuent à l'établissement potentiel redox intracellulaire. Il résulte, de ces diverses interactions, une homéostasie redox cellulaire. Le potentiel redox cellulaire détermine les proportions relatives des espèces oxydées ou réduites

de chaque couple redox. Ces proportions dépendent des potentiels redox (E°) de ces couples.

Cette fonction du potentiel redox cellulaire est particulièrement importante, car l'activité de

nombreuses protéines, et en particulier de nombreux facteurs de transcription, est régulée par leur état redox (Foyer and Noctor, 2005b, Noctor, 2006). Ainsi, dans des conditions normales, le cytoplasme cellulaire est un milieu très réducteur, ce qui a pour conséquence de maintenir la grande majorité des groupements thiols à l'état réduit (Foyer and Noctor, 2005b).

Les prooxydants

Chez les plantes, il existe de nombreuses sources cellulaires d'ERO, localisées à

divers endroits de la cellule. Les trois sources principales sont les chaînes de transport d'électrons (CTE) des chloroplastes et mitochondries, certaines enzymes comme les peroxydases et oxydases et enfin, les molécules photosensibilisatrices comme la chlorophylle.

2.1 Production d'ERO lors des principaux processus métaboliques

2.1.1 Les chloroplastes et l'appareil photosynthétique

Les cellules chlorophylliennes, du fait de leur production d'O2 au cours du processus photosynthétique, sont particulièrement exposées à la génération d'ERO. Le chloroplaste est

souvent considéré comme étant la principale source d'ERO chez les organismes photosynthétiques. Le processus photosynthétique est à l'origine de la formation directe d'1O2 et d'O2**.**- et indirecte d'H2O2 (par dismutation de l'O2**.**-) et d'**.**OH. Il y a encore peu de temps, le photosystème I (PSI) était considéré comme la source principale des ERO chloroplastiques. Dans des conditions physiologiques normales, le flux d'électrons du PSI est dirigé vers le NADP qui est réduit en NADPH par la ferrédoxine NADP réductase (FNR). Lors d'un stress (par exemple, une luminosité trop importante), la chaîne d'électrons peut se saturer. Une partie du flux d'électrons peut être alors dérivée par la ferrédoxine vers l'oxygène (Figure 4). Cette réaction est connue sous le nom de réaction de Mehler. En plus de la ferrédoxine, d'autres accepteurs d'électrons du PSI possèdent un potentiel redox suffisamment négatif pour réduire le dioxygène en anion superoxyde.

Ces dix dernières années, il est apparu que le PSII était également un site de génération d'O2 **.**-. Les quinones A et B du PSII seraient impliquées dans la perte d'électrons conduisant à la réduction de l'O2 (Figure 4). Certains auteurs ont même suggéré que la production chloroplastique d'anions superoxydes serait majoritairement le fait de cette perte d'électrons du PSII, en particulier au niveau des quinones B. La

chlorophylle a (Chl a) du PSII possède également la capacité de transmettre directement un électron à l'oxygène, en cas de saturation de la CTE (Hippeli *et al.*, 1999). Cette réaction dite photodynamique de classe I est caractérisée par les réactions suivantes :

Chl a + lumière → Chl a* (Chl a excitée)

Chl a* → +Chl a- (séparation des charges)

+Chl a- + O2 → +Chl a + O2

.Une fois produits, les ions O2

.- peuvent se retrouver dans le lumen où ils se protonent pour former des HO2 **.** susceptibles d'initier une peroxydation lipidique. Les anions superoxydes sont aussi produits dans le stroma où ils sont rapidement pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD), responsable de leur dismutation en H2O2.

La saturation de la CTE peut également conduire la Chl a du PSII à interagir avec le dioxygène, via une réaction photodynamique de classe II, induisant à la formation d'1O2 et non d'O2**.**-. Dans ce cas, la Chl a excitée ne trouve pas d'accepteur d'électrons et perd progressivement de son excitation par des dégagements de chaleur et un réarrangement des électrons sur sa couche orbitale externe. Ce réarrangement fait passer la Chl a de l'état singulet à triplet, le tout accompagné d'une inversion de spins. La Chl a, sous forme triplet, peut alors transmettre une partie de son énergie à une molécule de dioxygène dont la couche externe d'électrons se réorganise, conduisant à la formation d'oxygène singulet (Figure 4):

-Chl a + lumière → Chl a*

Chl a* (singulet) → Chl a* (triplet)

Chl a* (triplet) + O2 → Chl a (singulet) + 1O2

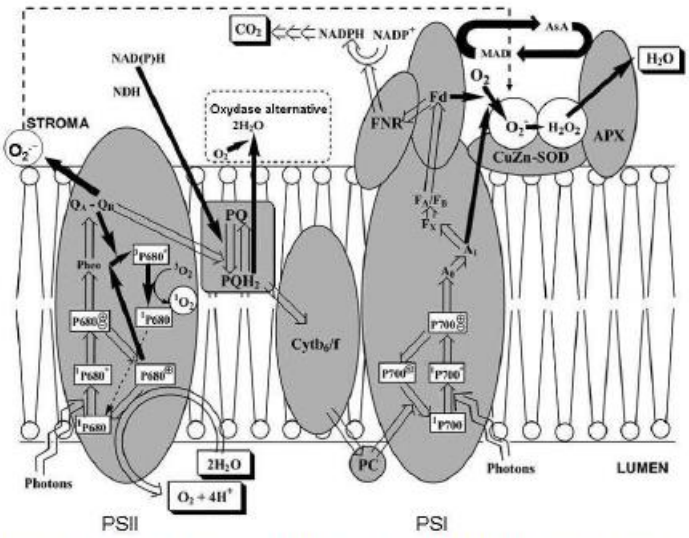


Figure 4 : Production d'oxygènes singulets au niveau du PSII et d'anions superoxydes au niveau des PSI et PSII des thylakoïdes chloroplastiques.

Les flèches claires représentent la photoexcitation au niveau des PS et les flux d'électrons dans les CTE, en condition physiologiques optimales. Les flèches noires représentent les évènements se déroulant lorsque le flux de photons ou d'électrons excède la capacité d'assimilation en CO2. A0, A1, FA, FB, FX , accepteurs d'électrons ; APX, ascorbate peroxydase, AsA, ascorbate ; Cytb6/f, cytochrome b6/f ; Fd, ferrédoxine, FNR, ferrédoxine NADP Réductase ; P680, molécule piège de chlorophylle du PSII ; P700, molécule piège de chlorophylle du PSI ; PC, plastocyanine ; Pheo, phéophytine ; PQ, plastoquinone ; PQH2, plastoquinole ; Q, quinones ; CuZnSOD, superoxyde dismutase à zinc.

2.1.2 Les mitochondries et la chaîne respiratoire

De la même manière que chez les autres organismes aérobies, les mitochondries constituent une source importante d'ERO chez les plantes. Néanmoins, chez ces dernières, la part de la production d'ERO due aux mitochondries, est variable en fonction de l'organe considéré et des conditions du milieu (en particulier l'ensoleillement). Ainsi, elles constituent la source principale d'ERO dans les cellules non-chlorophylliennes, alors qu'elles ne représentent qu'une faible part dans les cellules chlorophylliennes exposées à la

lumière. Les mitochondries des végétaux diffèrent de leurs homologues animales par une chaîne de transport d'électrons différentes, et des fonctions supplémentaires comme la participation au cycle de la photorespiration. De plus, les mitochondries des cellules photosynthétiques évoluent dans un environnement particulier, riche en oxygène et en carbohydrates.

Dans des conditions physiologiques normales, environ 2 % du dioxygène total consommé par la mitochondrie est transformé en ERO. De la même façon que pour la CTE des chloroplastes, c'est une saturation de la CTE mitochondriale qui semble être la cause des pertes d'électrons vers l'O2 (Figure 5). Les composés intermédiaires radicalaires d'ubisemiquinones, formés par la réduction du pool d'ubiquinones par les complexes I et III de la CTE, seraient les principaux donneurs d'électrons au dioxygène. Cependant, les flavoprotéines du complexe II pourraient également contribuer à cette production d'O2 **.**-).

La production d'ERO à proximité des CTE peut générer des dégâts membranaires (cf.4.2.2), induisant une diminution accrue de l'efficience de la CTE et une perte plus importante 'électrons. La résultante est une augmentation de la génération d'ERO diminuant d'autant plus l'efficience de la CTE. Ainsi, lors de stress importants, la génération initiale d'ERO peut conduire à un cycle délétère de production de ces espèces toxiques pour l'organisme. Ce cyclede production d'ERO mitochondriales est notamment considéré comme l'une des causes principales du vieillissement cellulaire.

Bien qu'il existe des photosensibilisateurs potentiels (précurseurs hémiques) au niveau des mitochondries, la production d'oxygène singulet n'y a pas été mise en évidence.

.

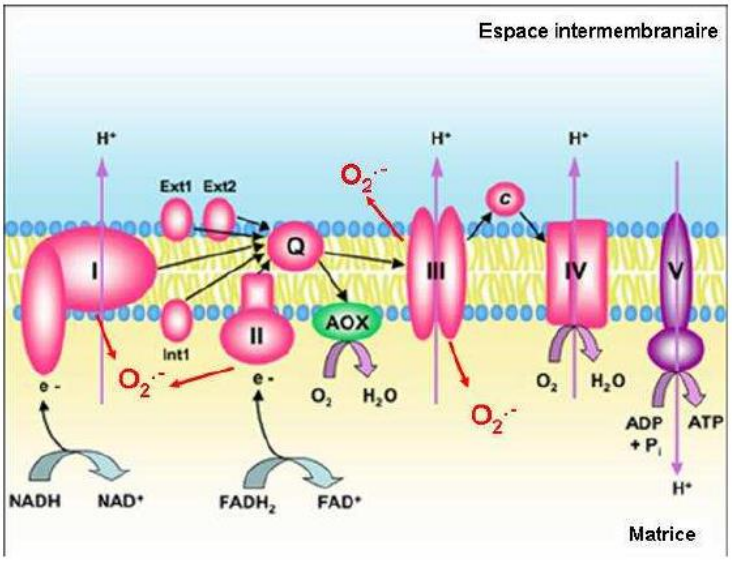


Figure 5 : Représentation de la chaîne respiratoire d'une mitochondrie.

Les flèches rouges représentent les « fuites » d'électrons vers l'O_2 permettant de former des anions superoxydes. Complexe I: NADH déshydrogénase, complexe II: succinate déshydrogénase, complexe III: cytochrome bc1, complexe IV: cytochrome c oxydase, complexe V: ATPase, Q: pool d'ubiquinone, AOX: oxydase alternative, c: cytochrome c, Ext1 and Ext2: NAD(P)H déshydrogénases externes.

2.1.3 Les peroxysomes

Les peroxysomes possèdent une structure simple, une taille réduite et une très grande quantité de catalases. En raison de ces caractéristiques, les peroxysomes ont longtemps été considérés comme des organites spécialisés dans la détoxication du peroxyde d'hydrogène.

Les peroxysomes sont en fait le siège d'une forte activité métabolique très centrée sur le métabolisme oxydatif. Ils possèdent de nombreux systèmes antioxydants et prooxydants. Les deux principales sources d'ERO peroxysomales sont la β-oxydation des acides gras et la photorespiration.

2.1.3.1 La β-oxydation

La β-oxydation est un processus fondamental pour les animaux, les levures mais encore plus pour les plantes. En effet, en dehors de leurs utilisations cataboliques, les composés dérivés de cette β-oxydation sont impliqués dans un très grand nombre de processus cellulaires. En particulier, cette fonction peroxysomale permet la synthèse de

molécules telles que l'acide jasmonique (AJ), l'acide indole acétique (AIA) ou l'acide salicylique (AS). Cependant, une étape de ce processus, l'oxydation de l'acyl CoA par la l'acyl CoA-oxydase, entraîne la réduction du FAD en FADH2. La régénération du cofacteur s'effectue par la réduction d'une molécule d'O2 entraînant la formation d'H2O2.

acyl CoA + FAD → 2-trans-enoyl CoA + FADH2 O2 + FADH2 → H2O2 + FAD

2.1.3.2 La photorespiration

La photorespiration est un processus vital pour les plantes. Bien qu'il apparaisse comme un mécanisme coûteux en énergie et peu rentable, ce mécanisme physiologique remplit le rôle de « soupape de sécurité » du photosystème, en évitant la saturation de la CTE chloroplastique. La photorespiration est un processus complexe illustrant bien les échanges de métabolites entre les différents composants cellulaires. En effet, il implique des réactions métaboliques dans le chloroplaste, la mitochondrie et le peroxysome. La réaction de transamination du glycolate, effectuée dans le peroxysome, conduit à la formation de glyoxylate et d'H2O2.

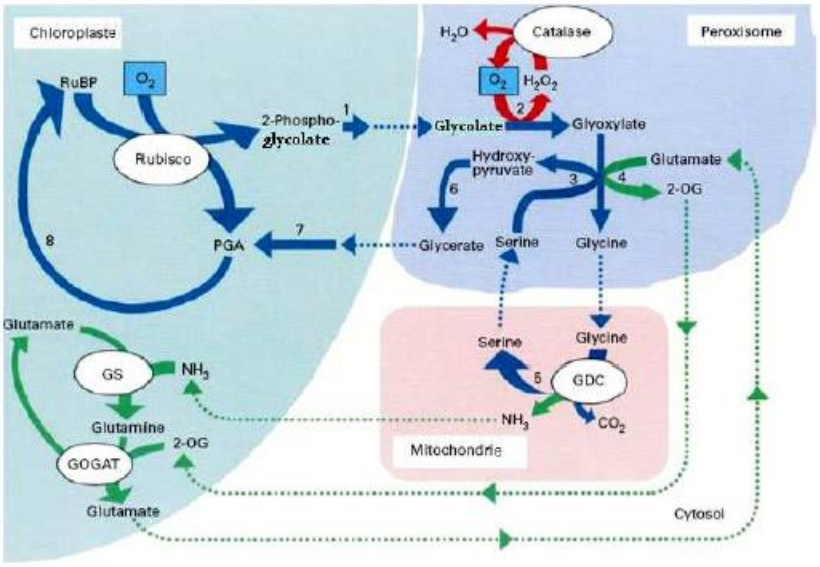


Figure 6 : Caractéristiques principales du métabolisme de la photorespiration (d'après Foyer and Noctor, 2000).

Les flèches pleines montrent des conversions métaboliques, les flèches pointillées, des mouvements entrecompartiments. Les flèches bleues présentent des réactions qui impliquent le recyclage du carbone, les vertesl'utilisation de l'azote et les rouges la production et détoxication de l'H2O2. Les enzymes impliquées dans ce métabolisme sont : 1, phosphoglycolate phosphatase ; 2, glycolate oxydase ; 3, sérine:glyoxylate aminotransférase ; 4, glutamate:glyoxylate aminotransférase ; 5, sérine hydrométhyl transférase ; 6, hydroxypyruvate réductase ; 7. glycérate kinase ; 8, enzymes réductrices de la voie des pentoses phosphates.

GDC : glycine décarboxylase ; GOGAT : glutamate synthase ; GS : glutamine synthétase ; 2-OG :2- oxoglutarate ; PGA : 3-phosphoglycérate.

2.1.3.3 La chaîne de transport des électrons peroxysomale

Les peroxysomes possèdent également la capacité de générer de l'O2 **.-**, via leur CTE (Fang *et al.*, 1987). Cette CTE, de taille réduite par rapport à celle des chloroplastes ou des mitochondries, serait un système à trois composantes, formé par une protéine homologue à la

monodéhydroascorbate réductase, une protéine homologue au cytochrome b5 et une protéineinconnue de 29 kD. Le rôle de cette CTE serait de régénérer du NAD+ et du NADP+ nécessaire au métabolisme du peroxysome. De la même façon que pour les autres CTE, l'O2 est un accepteur potentiel d'électrons en cas de saturation de la CTE.

.2 Les principales sources enzymatiques

Les plantes possèdent plusieurs enzymes ou complexes enzymatiques responsables d'une production d'ERO plus ponctuelle que celle induite par les grandes fonctions métaboliques. Cependant, ces générations ponctuelles sont à l'origine de « flambées oxydatives » (oxidative burst) pouvant être impliquées dans des processus physiologiques bien spécifiques comme la croissance cellulaire, mais surtout dans la réponse aux stress

biotiques et abiotiques.

2.2.1 Les NADPH-oxydases

Le phénomène de flambées oxydatives est un phénomène bien connu chez les mammifères, participant à la lutte contre les infections par des microorganismes. Les NADPH-oxydases (NOX), en particulier celles associées aux macrophages, sont les principales sources d'ERO à l'origine de cette flambée oxydative. Les NOX forment une famille multigénique de sept membres chez l'Homme. Ce complexe enzymatique est constitué par deux protéines membranaires gp91phox et p22phox (phox pour phagocyte oxydase) formant un flavocytochrome b558 hétérodimérique. L'activation de ce complexe nécessite la translocation vers la membrane plasmique de trois composants régulateurs cytosoliques, les protéines p40phox, p47phox et p67phox, se liant aux protéines membranaires pour former le complexe actif de la NOX. Deux petites protéines, rap1A et p21rac, appartenant à la famille des GTPases Rho, complètent ce complexe. Il semblerait que l'activation de la NOX soit initiée par la phosphorylation des

composants cytosoliques, par une protéine kinase C (PKC). Chez les mammifères, l'association des composants membranaires et cytosoliques est indispensable au fonctionnement du complexe enzymatique réduisant l'O2 en O2 **.-**.

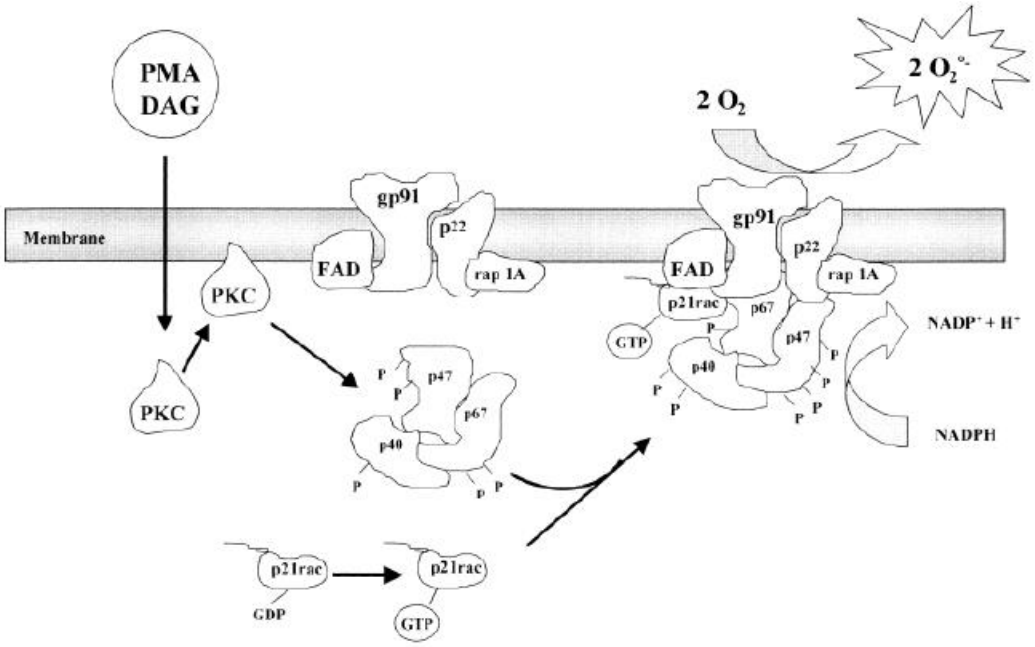


Figure 7 : Régulation du complexe enzymatique de la NOX chez les mammifères (d'après Morena *et al.*, 2002).

La brusque production d'ERO n'est pas une exclusivité animale puisqu'elle a également été détectée chez les plantes, en particulier lors d'interactions plantes-microorganismes. Par analogie avec le mode de production d'ERO dépendant de la NOX chez les mammifères, de nombreux scientifiques ont recherché des homologues de ce complexe enzymatique chez les plantes. L'utilisation de diphénylène iodonium (DPI), un inhibiteur pharmacologique de la NOX, a permis de mettre en évidence son implication dans la flambée oxydative induite lors d'une infection par des pathogènes. L'utilisation d'anticorps dirigés vers les protéines humaines p40phox, p47phox, et p67phox a révélé l'existence de protéines homologues, de tailles comparables, chez les plantes. Il n'existe pas d'homologue de la protéine GTPase p21rac participant à la régulation des NOX animales. Cependant, d'autres GTPases, homologues des GTPases Rho animales et nommées ROP (pour Rho-like protein), semblent tenir ce rôle.

Des techniques de clonage moléculaire ont été utilisées, en particulier pour

caractériser la protéine gp91phox contenant le site catalytique du complexe de la NOX. Les différentes études menées ont identifié une famille multigénique, codant pour des protéines d'environ 105 kD nommées Rboh (pour respiratory burst oxidase homolog). Ces protéines contiennent une région C-terminale montrant des similitudes prononcées avec celle de la protéine gp91phox. Les protéines Rboh, comme leurs homologues gp91phox, contiennent six domaines transmembranaires ainsi que des domaines de liaison au FAD et NADPH dans leur partie C-terminale (Figure 8). Les troisième et cinquième domaines transmembranaires lient, par quatre liaisons avec de l'histidine, deux groupes hémiques indispensables à la réduction du dioxygène en anion superoxyde. De plus, les Rboh végétales

présentent des analogies plus prononcées avec la protéine gp91phox de la NOX5 humaine qu'avec celle des autres NOX, en possédant un large domaine hydrophile N-terminal qui contient deux motifs « EF hand » de liaison au calcium.

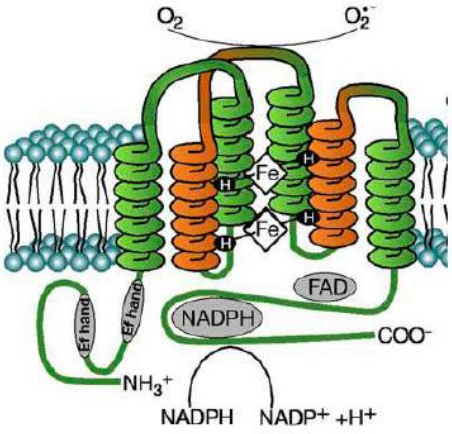


Figure 8 : Représentation schématique d'une protéine Rboh (d'après Sagi and Fluhr, 2006).

Bien que les différents composants cytosoliques aient été identifiés chez les plantes, il

semble que leur association aux protéines membranaires ne soit pas indispensable à

l'activité de la NOX et qu'un afflux de calcium suffise à activer la protéine Rboh. Toutefois, les composants cytosoliques permettraient de réguler l'activité de cette dernière comme l'ont démontré Xing et collaborateurs (1997) dans des cultures cellulaires de tomates. Ces auteurs ont également démontré l'importance de la phosphorylation des composants cytosoliques dans cette régulation. Cependant, la PKC ne serait pas impliquée dans cette phosphorylation. Bien qu'une activité PKC ait été détectée chez la pomme de terre, les gènes codant pour cette protéine n'ont pas encore été identifiés. Il semblerait qu'un autre type de protéine kinase (PK) soit impliqué dans la régulation de l'activité NOX chez les plantes.

La famille multigénique des Rboh est composée d'au moins dix membres chez *Arabidopsis thaliana*. Leur expression dans l'organisme n'est pas uniforme. Seules les Rboh D et F s'expriment dans toute la plante alors que cinq autres (A, B, C, G et I) s'expriment spécifiquement dans les racines.

Contrairement aux NOX animales, les NOX végétales ne semblent pas cantonnées à la défense de l'organisme contre les pathogènes. Elles sont notamment impliquées dans la génération d'ERO nécessaires à l'élongation pariétale ou la subérisation, mais aussi dans la production d'ERO en réponse à de nombreux stress abiotiques comme les stress hydrique, salin, ozoné ou anoxique. Les NOX sont également responsables de la flambée oxydative induite par certains métaux lourds comme le cadmium ou le cuivre.

2.2.2 Les peroxydases extracellulaires

Les peroxydases végétales (POX) appartiennent à la superfamille des peroxydases, extrèmement répandue dans le monde vivant et composée de trois classes différentes:

- les POX classe I sont des enzymes intracellulaires,
- les POX de classe II sont des POX libérées par les champignons,
- les POX de classe III correspondent aux peroxydases sécrétées par les cellules

végétales.

En dehors de l'ascorbate peroxydase (APX ; POX de classe I), les POX de classes III correspondent à la classe de POX la plus importante et de loin la plus étudiée chez les plantes.

Elles sont présentes dans tous les végétaux, mis à part les algues vertes unicellulaires. Cette omniprésence dans la lignée verte s'accompagne d'une complexification et d'une diversification de l'usage des POX au cours de l'évolution.

En effet, la classe III est un groupe multigénique dont le nombre de copies par plante semble être

corrélé à la complexité de la plante et de son biotope. Ainsi, 73 gènes codant pour des POX sont présents dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, et 138 copies ont été découvertes dans celui d'*Oriza sativa*. Cette redondance apparente cache, en réalité, une diversité très importante au sein de ces POX, puisqu'elles présentent entre elles des homologies allant de 93 %, pour les plus proches, à 28 %, pour les plus éloignées.

Une telle diversité ne peut s'expliquer que par de très nombreuses fonctions au sein de la plante et certains auteurs n'hésitent pas à les qualifier de véritables « couteaux suisses ». Les POX s'expriment tout au long de la vie de la plante, de la germination à la sénescence, interviennent dans tous les processus physiologiques et participent à la réponse aux différents stress. Des études d'expression génique chez *Arabidopsis thaliana* et *Oriza sativa* ont montré une grande spécificité spatiale et temporelle dans leurs profils d'expression. Au vue de la diversité des rôles endossés par les POX chez les plantes, il ne sera pas fait, dans cette étude, un inventaire exhaustif. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont déjà publié des revues bibliographiques sur le sujet. Nous nous intéresserons seulement à leurs fonctionnalités liées aux ERO.

Les POX III sont présentes sous la forme soluble dans l'apoplaste, ou liées de façon

covalente ou ionique à la paroi cellulaire. Elles possèdent une ferriprotoporphyrine IX comme groupe prosthétique et deux résidus d'acides aminés très conservés au niveau du site catalytique. Ces enzymes catalysent la réduction d'un composé oxydé, en arrachant un électron à une grande variété de substrat allant des composés phénoliques aux précurseurs des lignines, en passant par l'auxine. Cependant, leur rôle principal est de réduire l'H2O2 :2 Donneurréd + H2O2 + 2 H+ → 2 DonneurOx + H2O

Paradoxalement, les POX possèdent également la capacité de générer des ERO. Cette production d'ERO NAD(P)-dépendante intervient en particulier dans la réponse aux stress. Toutefois, dans la plupart des cas cette induction est transitoire. En effet, le profil d'induction des POX présente souvent une forte induction au début d'un évènement particulier (stress, initiation de la croissance cellulaire…) puis une diminution au cours du temps. Dans certains cas, comme les interactions plante-microorganismes, les POX de classe III sont considérées comme les sources principales d'H2O2 lors de la flambée oxydative. Elles seraient également impliquées dans la réponse oxydative à certains métaux lourds. Cependant leurs réponses varient considérablement d'une étude à l'autre, en fonction de l'espèce considérée, du métal utilisé, de la dose et de la durée du traitement.

2.2.3 Les oxalate-oxydases

Les oxalate-oxydases (OxO ; EC 1.2.3.4) sont une famille de protéines apparentées aux germines (Germin-like) se retrouvant aussi bien chez les Angiospermes que les Bryophytes et

Gymnospermes . Cependant, les OxO

sont présentes de façon bien plus importante chez les Monocotylédones. Ces protéines, très hétérologues entre elles, possèdent quelques caractéristiques communes comme d'être solubles dans l'eau, thermostables et résistantes aux protéases.

Elles catalysent la conversion de l'oxalate en CO2 et H2O2 :HOOC-COOH + O2 →

2 CO2 + H2O2

Les OxO sont présentes en majorité à la surface des graines en formation, mais également dans l'apoplaste de tissus âgés de racines et de gaines vasculaires (Dumas *et al.*, 1995). La localisation bien spécifique des OxO dans l'organisme, laisse penser que ces enzymes participent à la mise en place de tissus définitifs en libérant du peroxyde d'hydrogène. Cette libération permet de « terminer » la croissance cellulaire en favorisant les liaisons covalentes entre les différents constituants pariétaux. Elles pourraient également jouer une rôle dans la mort cellulaire programmée, induite dans les couches superficielles des graines, constituant ainsi une barrière protectrice entre la graine et les pathogènes (Lane, 2000).

En dehors de ces rôles physiologiques pour la plante, le rôle des OxO semble être principalement la défense contre les microorganismes. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de l'activité OxO ou de la transcription des gènes codants pour

ces protéines dans des plantes infectées par des microorganismes. Il apparait logique que la plante possède des OxO apoplastiques, car de nombreux champignons, comme *Sclerotinia sclerotinium*, sécrètent de l'acide oxalique lorsqu'ils pénètrent dans les tissus végétaux. Cette sécrétion leur permet de séquestrer le calcium et d'acidifier les parois, ce qui facilite l'action des enzymes de dégradation fongiques. L'action des OxO permet alors de ralentir la pénétration de ces champignons, mais également de générer de l'H2O2 toxique pour ces microorganismes.

Les OxO pourraient également participer à la réponse à l'auxine ou à des stress abiotiques comme certains métaux lourds (Berna and Bernier, 1999). Cependant, l'expression génique de l'OxO n'est pas régulée de la même manière pour tous les éléments traces métalliques (ETM). Le cadmium, le cuivre et le cobalt activent son

expression contrairement au zinc ou au nickel (Berna and Bernier, 1999).

2.2.4 Les amine-oxydases

Les amine-oxydases (AO) sont des enzymes ubiquitaires catalysant la désamination oxydative d'une grande variété d'amines :

$RCH2NH2 + O2 + H2O \rightarrow RCHO + NH3 + H2O2$

Les AO des plantes ne forment pas un groupe homogène, mais plutôt deux groupes distincts : les AO contenant du cuivre (CuAO) et les polyamine-oxydases contenant une flavine (PAO). Les CuAO (EC 1.4.3.6) sont des homodimères dont chaque sous-unité contient un ion cuivre et une 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone (TPQ) servant de cofacteur. Leurs substrats sont des diamines, essentiellement la putrescine et la cadavérine. Les CuAO se retrouvent essentiellement chez les Dicotylédones, et en particulier chez les légumineuses. Au niveau cellulaire, les CuAO sont généralement associés à la paroi.

Les PAO (EC 1.4.3.4) sont liées de façon non covalente à une molécule de FAD jouant le rôle de cofacteur. Ces enzymes catalysent l'oxydation de polyamines comme la spermidine (triamine) ou la spermine (tetraamine). Elles sont exprimées essentiellement chez les Monocotylédones et se retrouvent localisées au niveau des parois cellulaires. Cependant, certaines PAO, comme la BPAO2 de l'orge, sont cytosoliques.

Les AO ne sont pas seulement un moyen de dégrader les amines cellulaires. Elles interviennent dans de nombreux processus physiologiques, en particulier dans la croissance et le développement. Les CuAO et PAO sont régulées par des facteurs externes, comme la lumière, ou internes, comme certaines hormones, et participent aux modifications des structures membranaires et pariétales.

Certains auteurs ont trouvé une corrélation positive entre la lignification de la paroi, l'activité

peroxydasique et l'activité des CuAO. La présence de

grande quantité de CuAO ou de PAO dans les trachéides en formation et les cellules de la

coiffe racinaire suggère l'idée que les AO pourraient aussi jouer un rôle dans la mort cellulaire programmée.

Les AO interviennent de façon très importante dans les relations que les plantes vont entretenir avec les microorganismes symbiotiques ou pathogènes. De très nombreuses études ont porté sur ce sujet, et il apparaît que les AO sont fortement activées par la présence de ces microorganismes. Contrairement aux stress biotiques, l'implication des AO lors de stress abiotiques a été peu étudiée. Un stress hydrique cause l'activation des CuAO et des PAO. Ces enzymes sont aussi activées par un stress thermique, un stress halin ou métallique (. Elles semblent par contre insensible à l'ozone .

2.2.5 Les oxydases peroxysomales

En dehors de la glycolate-oxydase responsable de la libération d'H2O2 au cours de la photorespiration, les peroxysomes possèdent d'autres oxydases, qui sont autant de sources potentielles d'ERO. La plus importante est la xanthine-oxydase. Lorsque l'on s'intéresse à cette enzyme, il faut plutôt étudier le couple xanthine-oxydase (XOD ; EC 1.17.3.2)/ xanthine-déshydrogénase (XDH ; EC 1.17.1.4). Ces deux protéines sont codées par un même gène, utilisent les mêmes substrats et peuvent s'interconvertir :

XDH + GSSG <=> XOD + 2 GSH

Ces deux enzymes d'environ 270 kD, localisées dans les peroxysomes des plantes, jouent un rôle majeur dans le catabolisme des purines. Elles catalysent principalement l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique.

La XOD peut utiliser d'autres substrats comme d'autres purines, des ptérines et des aldéhydes. La différence entre les deux enzymes se situe au niveau des accepteurs d'électrons qu'elles utilisent, puisque la XDH se sert du NAD alors que la XOD utilise le

dioxygène. Cette différence est très importante, car l'activité de la XOD s'accompagne de la libération de peroxyde d'hydrogène :

hypoxanthine + O2 + H2O → xanthine + H2O2

xanthine + O2 + H2O → acide urique + H2O2

Cependant, dans certaines conditions, la XOD peut également générer des anions superoxydes plutôt que du peroxyde d'hydrogène :

R-H + H2O + 2 O2 → ROH + 2 O2

.-+ 2 H+

La XOD joue un rôle complexe dans le métabolisme oxydatif : d'une part, elle possède un aspect prooxydant en générant des ERO, et d'autre part, son activité génère de l'acide urique, un puissant antioxydant, ou permet la détoxication de certains aldéhydes cytotoxiques issus de la peroxydation lipidique, comme le 4-hydroxy-2-alkenal.

Chung et collaborateurs (1997) ont montré que la protéolyse et la présence d'ERO induisaient la formation d'une forme irréversible de XOD (ne pouvant plus s'interconvertir avec la XDH), favorisant ainsi la formation d'ERO.

En plus de la xanthine-oxydase, trois autres oxydases sont présentes dans le peroxysome. L'urate oxydase (EC 1.7.3.3) est fortement associée à la XOD puisqu'elle participe au métabolisme des purines en oxydant l'acide urique :

Acide urique + O2 → allantoïne + H2O2 + CO2 + O2.-

Bien que plus marginales, les sulfite- et sarcosine-oxydases (EC 1.8.3.1 et EC 1.5.3.1) participent à la production d'H2O2 du peroxysome, en oxydant leurs substrats respectifs :

SO32- + H2O+ O2 → SO4 2- + H2O2

Sarcosine + H2O+ O2 → glycine + HCHO + H2O2

Plusieurs études ont démontré que la production d'ERO dans le peroxysome est

induite par différents stress. Cependant, il semble que la XOD et la CTE ne soient pas affectées par ces différents stress.

La production d'ERO serait essentiellement une production primaire d'H2O2 (ne dérivant pas de la dismutation de l'O2 **.**-), mais le mécanisme reste inconnu.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

ABBAS M.K., ALI A.S., HASAN H.H. and GHAL R.H., 2013 - Salt Tolerance Study of Six Cultivars of Rice (*Oryza sativa* L.) During Germination and Early Seedling Growth. *Journal of Agricultural Science.,* 5(1) :1-10.

2. ABBASDOKHT H., EDALATPISHE M.R. and GHOLAMI A., 2010 - The Effect of Hydropriming and Halopriming on Germination and Early Growth Stage of Wheat (*Triticum aestivum* L.).*International Scholarly and Scientific Research & Innovation,* 4(8) : 551- 555.

3. ABE H., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., URAO T., IWASAKI T., HOSOKAWA D., SHINOZAKI K., 1997 - Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell,* 9: 1859-1868.

4. AFZAL I., BASRA S. M. A., HAMEED A. and FAROOQ M., 2006 - Physiological enhancements for alleviation of salt tolerance in spring wheat. *Pak. J. Bot.,* 38 : 1649–1659.

5. AFZAL I., RAUF S., BASRAAND S.M.A. and MURTAGA G., 2008 - Halopriming improves vigor, metabolism of reserves and ionic contents in wheat seedlings under salt stress. *Plant Soil Environ.,* 54 : 382-388.

6. AHMED Z., SHEIKH M.A., HAMEED A. and SALAH UDDIN., 2012. Investigation of antioxidant enzymesand biochemical changes in the wheat seeds(freed)induced by different pre-sowing treatments. *World Appl. Sci. J.*, 18(1): 31-36.

7. ALLEN J.A., CHAMBERS J.L., and STINE M., 1994 - Prospects for increasing the salt tolerance of forest trees: a review. *Tree Physiology*, 14 (7-8-9) : 843-853.

8. ALOUI H., SOUGUIR M., LATIQUE S. and HANNACHI C., 2014 - Germination and growth in control and primed seeds of pepper as affected by salt stress. *Cercetari Agron. Moldova.*, 47: 83–95.

9. AMUTHAVALLI P., ANBU D., and S. SIVSANKARAMOORTHY S., 2012 - Effect of calcium chloride on growth and biochemical constituents of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Int. J. Res. Bot*., 2(3) : 9-12.

10. ANBU D., SIVASANKARAMOORTHY S., 2014 - Ameliorative effect of CaCl2 on growth, membrane permeability and nutrient uptake in *Oryza sativa* grown at high NaCl salinity. *International Letters of Natural Sciences*, 3: 14-22.

11. AN P., LI X., ZHENG Y., ENEJI A. E. AND INANAGA S., 2014 - Calcium effects on root cell wall composition and ion contents in two soybean cultivars under salinity stress . *Can. J. Plant Sci.*, 94 : 733-740.

12. ANOUN N. et ECHIKH N., 1990 - Etude bio systématique d'une légumineuse saharienne : le Tadelaght. Mémoire DES, Univ. Sci. Technol. "Houari Boumedienne", Bab Ezzouar, Algérie, 101 p.

13. ANSARI O., SHARIF-ZADEH F., 2012- Osmo and hydro priming improvement germination characteristics and enzyme activity of Mountain Rye (*Secale montanum*) seeds under drought stress. *J. Stress Physiol. Biochem*., 8 : 253–261.

14. APSE M.P., AND BLUMWALD E., 2007- Na+ transport in plants. *FEBS Lett.*

581(12) :
2247–2254.
15. ARSHI A., ABDIN M.Z. and Iqbal M., 2006- Sennoside content and yield attributes of *Cassia angustifolia* Vahl. as affected by NaCl and CaCl2. *Sci. Hortic*., 111: 84-90.
16. ASHRAF M., RAFFIA M. Z., and ASHRAF M. Y., 2003 - Time-course changes in the inorganic and organic components of germinating sunflower achenes under salt (NaCl) stress. *Flora.*, 198: 26–36.
17. ASHRAF M. and FOOLAD M. R., 2005 - Pre-sowing seed treatment a shotgun approach
to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Adv Agron.*, 88 : 223–271. 106
18. ASHRAF M., and Foolad M. R., 2007 -Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2) : 206-216.
19. ASHRAF M., ATHAR HR., HARRIS PJC. And KWON TR., 2008 - Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Adv Agron*., 97: 45–110.
20. ASHRAF M. and FOOLAD M.R., 2013- Crop breeding for salt tolerance in the era of molecular markers and marker-assisted selection. *Plant Breeding*, 132: 10-20.
21. ATAK M., KAYA M.D., KAYA G., IKILI Y., and ÇIFTÇÜ C.Y., 2006- Effects of NaCl on the germination, seedling growth, and water uptake of triticale. *Turk J Agric For.*, 30: 39-47.
22. AUSSENAC G., GRANIERA A., NAUD R., 1982 – Influence d'une éclaircie sur la croissance et le bilan hydrique d'un jeune peuplement de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Mirb.) franco). *Canadian Journal of Forest Research*, 12 (2): 222-231.
23. AYERS R. S. and WESTCOT D. W., 1985 - Water quality for agriculture. FAO,

Rome,

174 p.

24. BAATH G.S., SHUKLAA M.K., BOSLANDA P.W, STEINERB R.L., and WALKER S.J., 2017 - Irrigation water salinity influences at various growth stages of *Capsicum annuum*. *Agricultural Water Management*, 179: 246-253.

25. BEFFAGNA N, BUFFOLI B. nd BUSI C., 2005 - Modulation of reactive oxygen species

production during osmotic stress in *Arabidopsis thaliana* cultured cells : involvement of the plasmamembrane Ca2+-ATPase and H+-ATPase. *Plant Cell Physiol.,* 46 : 1326-1339.

26. BAKHT J., ISLAM A., TAYYUB M., ALI H and SHAFI M., 2011 - Antimicrobial potentials of *Eclipta alba* by disc diffusion method. *Afr. J. Biotechnol.,* 10:7668-7674.

27. BASRA S.M.A., PANNU I.A. and AFZAL I., 2003 - Evaluation of seedling vigor of hydro and matriprimed wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. *Int. J. Agric. Biol.,* 5(2) : 121-123.

28. BASRA S.M.A., AFZAL I., HAMEED A. and RASHID R.A., 2005 - Inducing salt tolerance in wheat by seed vigor enhancement techniques. *Int. J. Agric. Biol.,* 2(1): 173-179.

29. BASRA S.M.A., ZIA M.N., MAHMOOD T., AFZAL I., KHALIQ A., 2002 – Comparison of different invigoration techniques in wheat (Triticum aestivum L.) seeds. Pak. J.

Arid. Agric., 5: 11-16.

30. BAUDOIN J.P. and MARÉCHAL R., 1985 - Cowpea taxonomy, origin and germplasm.

In: Cowpea research, production and utilization. Singh S.R., Rachie K.O (ed). Wiley, New York, 3-9.

31. BAYUELO-JIMÉNEZ J.S., GRAIG R. and LYNCH J.P., 2002 - Salinity tolerance of *Phaseolus* species during germination and early seedling growth. *Crop Sci*., 42: 1584-1594.

32. BEATTY K. D. and EHLIG C. F., 1973 - A technique for testing and selecting for salt tolerance in sugarbeet. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.,* 17: 295-299.

33. BELKHODJA M., et SOLTANI N., 1992- Réponses de la fève *(Vicia faba* L.*)* à la salinité : Etude de la germination de quelques lignées à croissance déterminée. *Bull Soc Bot Fr.,* 139 : 357-368.

34. BELKHODJA M. et BIDAI Y., 2004 - Réponse des graines *d'Atriplex halimus* L. à la salinité au stade de la germination. *Sécheresse,* 15 (4): 331-335.

35. BENAMAR A., TALLON C. and MACHEREL D., 2003 – Membrane integrity andoxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. *Seed. Sci. Res.*, 13 : 35-45.