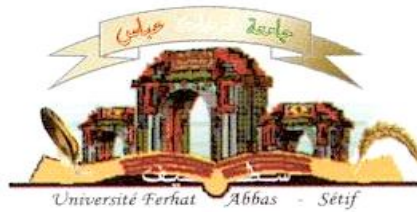


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف
كلية علوم الطبيعة و الحياة

N°...../SNV/2

DEPARTEMENT D'ÉCOLOGIE & BIOLOGIE VÉGÉTALE

THÈSE

Présentée par : **NEFFAR Fahima**

Pour obtenir le diplôme de **Doctorat en Sciences**

Option : Biologie Végétale

THÈME

Analyse de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress abiotique dans différents génotypes de blé dur (*Triticum durum*) et d'orge (*Hordeum vulgare*) soumis à la sécheresse.

Soutenue publiquement le 14/01/2013

DEVANT LE JURY

PRESIDENT	BENMAHAMMED Amar	Pr. FAC SNV. UFASétif
RAPPORTEUR	BOUZERZOUR Hamenna	Pr. FAC SNV. UFASétif
CO- RAPPORTEUR	CATTIVELLI Luigi	Pr. Centre Génomique Italie
EXAMINATEUR	OUJHJIH Bachir	Pr. ISVSA. UCHL Batna
EXAMINATEUR	BENBELKACEM Abdelkader	Dr. INRAA Constantine

Année universitaire 2011/2012

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, Louanges et Gloire à ALLAH, le tout puissant, de m'avoir donné la volonté, le courage et surtout la patience pour surmonter les nombreuses difficultés rencontrées au cours de ce chemin qui est la 'thèse' et d'être, enfin, arriver à la fin. Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une bourse PNE, octroyée par le Ministre de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS) Algérien. Je remercie vivement le MESRS pour cet octroi, comme je remercie autant la partie Italienne, représentée par le laboratoire du CRA-Institut expérimental pour la céréaliculture, section de Fiorenzuola d'Arda qui a mis ma disposition les moyens et les conditions adéquates pour la réalisation de cette recherche.

Le trajet est aussi important que la destination, on le dit souvent ! Toutes ces années passées m'ont permis de comprendre la signification de cette phrase toute simple. Ce parcours, en effet, ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures, si ce n'est de longues journées voire de longues années de méditation, d'attente et d'espoir.

Je remercie sincèrement le Pr. Hamenna BOUZERZOUR de m'avoir aidé, en tant qu'encadreur, à franchir ce tunnel interminable au moment où j'ai complètement perdu le « Nord géographique » ! Je le remercie pour sa patience et sa grande sagesse bienfaisante à certains moments.

Je remercie particulièrement le Pr. Luigi CATTIVELLI pour m'avoir donné l'occasion de côtoyer les membres de son équipe.

Je remercie également le Pr. Amar BENMAHAMMED d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie vivement le Pr. Bachir OUDJEHIH, de l'Université EL Hadj Lakhdar de Batna et le Dr. Abdelkader BENBELKACEM, Directeur de

Recherche et Directeur du Programme National d'Amélioration du Blé dur (PNAB) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Algérie, d'avoir accepté et pris sur leur temps pour examiner et évaluer consciencieusement ce travail.

Je remercie les sélectionneurs de la Station Expérimentale Agricole de l'Institut Technique des Grandes Cultures (SEA, ITGC) de Sétif d'avoir mis à ma disposition gracieusement les semences des cultivars d'orge Tichedrett et Fouara.

Je remercie également l'ensemble du personnel de l'Institut Expérimental pour la Céréaliculture de Fiorenzuola d'Arda et en particulier,

- DonataPagani,
- CatérinaMarè
- Fulvia Rizza

pour les discussions scientifiques sur une thématique des plus intéressantes, les nombreuses lectures de la première mouture de cette thèse et tout simplement pour leur patience de m'avoir soutenu jusqu'au terme de ce parcours,

- Frantz Badeck pour ses nombreux conseils,
- ElizabettaMazzuocotelli pour l'"ultime" lecture et correction de l'"introduzione",
- Sandro, Simona, Catérina et Valentina pour les moments d'amitié passés ensemble,
- Renzo Alberici d'avoir sauvé, à maintes reprises, mon micro d'une "mort certaine",
- Gianni Tacconi pour l'aide apporté à la mise au point de la pagination et l'écriture du sommaire,

- Sylvana, la "mamma" que j'ai trouvé à Fiorenzuola d'Arda, je me rappellerai toujours sa gentillesse et "la sua buona pasta e la sua buona cucina".

- enfin, et pas les moindres, du fond du cœur, mes remerciements et mon profond respect vont au Pr. Michèle Antonio STANCA et Madame STANCA, Myriam Odoardi, pour leur soutien continu et désintéressé et pour le temps qu'ils m'ont consacré pour me faire visiter un bout de leur beau pays et les nombreuses invitations pour me mettre au goût de la cuisine Italienne.

Fahima NEFFAR

A MA MERE

SOMMAIRE

<i>Remerciements</i>	<i>I</i>
<i>Dédicaces</i>	<i>III</i>
<i>Sommaire</i>	<i>V</i>
<i>Résumé en Arabe</i>	<i>IX</i>
<i>Résumé en Français</i>	<i>X</i>
<i>Résumé en Anglais</i>	<i>XI</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>XII</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>XV</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>XVIII</i>
Introduction	1
CHAPITRE I. Revue bibliographique	3
1. Approche de la tolérance au déficit hydrique	3
2. Réponse physiologique à la carence hydrique	7
3. Réponse moléculaire à la carence hydrique	10
3.1. Modifications post-transcriptionnelle et post- traductionnelle	11
4. Régulation de l'expression génique en réponse à la carence	
Hydrique	15
4.1. Les facteurs de transcription	15

4.2. Voie de l'ABA dépendante et de l'ABA indépendante des CBF/DREB	16
4.3. Facteurs de transcription WRKY	20
4.4. Expression génique en réponse au stress hydrique: les osmolytes	20
4.4.1. Accumulation de la proline	21
4.4.2. Gaba-shunt (Delta-acide aminé butyrique)	22
4.4.3. Accumulation de polypeptides hydrophiles	24
5. REGULATION POST-TRANSCRIPTION ET POST-TRADUCTION	24
 CHAPITRE II. Matériel et Méthodes	
1. Site et matériel végétal	26
2. Conditions expérimentales	27
3. Notations	29
3.1. Morphologie	29
3.2. Quantification du RNAt	29
3.3. Synthèse du premier brin de ADNc	31
3.4. Démultiplication de ADNc	32
3.5. Normalisation des échantillons	33
3.6. Préparation du gel d'agarose	34
3.7. Amorces testées	35

3.8. Analyse des données	38
--------------------------	----

CHAPITRE III. Résultats et Discussion

1. Evolution de la surface foliaire et la biomasse accumulée	
sous l'effet du déficit hydrique	39
1.1. Variation de la teneur en eau du sol cultivé des traitements hydriques modéré et sévère	39
1.2. Effet du stress hydrique sur l'évolution de la longueur et la surface foliaires	42
1.2.1. Effet du stress hydrique sur la longueur cumulée du feuillage du brin-maître	42
1.2.2. Effet du stress hydrique sur la surface foliaire du brin-maître	44
1.2.3. Effet du stress hydrique sur l'accumulation de la biomasse aérienne du brin-maître	46
2. Effet du stress hydrique sur l'Expression des genes <i>Cbf</i> chez le Blé Dur	51
3. Effet du stress hydrique sur l'Expression des <i>Cbf</i> chez l'orge	55
3.1. Régulateurs de transcription et post-traduction	55
4. Enzymes des molécules osmoprotectives	60
4.1. Le Gaba-Shunt	60
4. 2. Accumulation de proline	62
4. 3. Les déhydrines	63

Discussion générale	65
Conclusion et perspectives	68
Références Bibliographiques	69
Article 1	87
Article 2	88
Posters	89

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABA:	abscissicAcid
ABRE:	ABA Responsive Element
ANAC:	AcidAbscissic responsive NAC
AP2:	Apetala 2
BHLH:	Basic-Helix-loop-Helix
BLT:	Barley Low Temperature
CBF:	C-Repeat Binding Factors
CDPKs:	Calcium Dependant Protein kinase
CE:	Coupling Element
COR:	Cold- Regulated
DHN:	Dehydrin
DRE:	Drought Responsive Element
DREB:	DRE-Binding protein
GABA:	Δ -AminobutyricAcid
GAD:	Glutamate Décarboxylate
HOS1:	High Expression of Osmotically responsive gene 1
ERF:	Ethylene Responsive Factor
ERD:	Early Responsive to Dehydration
HD-ZIP:	HomeodomainLeucine Zipper

ICE1:	Inducer of CBF expression 1
KIN:	Cold-Inducible
LEA:	Late Embryogenesis Abundant
LTI:	Low Temperature Induced
LTRE:	Low Temperature Responsive Element
mRNA:	RNA messenger
MDa:	Mégadalton
MYC:	Family of transcription factors (BHLH & bZIP)
MYB:	Family of transcription factors (Trp cluster motif)
NAC:	Nascent polypeptide-Associated Complex
NACRS:	NAC Recognition Sequence
nsLTPs:	Non-Specific Lipid-Transfer Protein
P5CS:	Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase
RING:	Really Interesting Gene
RPS1:	Promotor Region of Spinach of the Site 1
RWC:	Relative Water Content
ROS:	ReactiveOxygen Species
sRNA:	Small RNA
SNAC1:	Stress-Responsive NAC1
SNF1:	kinase of yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

SSADH: Succinic Semi-Aldehyde Dehydrogenase

SUMO: Small Ubiquitin-Related Modifier

SWC: Soil Water Content

LISTE DES FIGURES

Figure1. Schéma intégré des approches empirique, physiologique et moléculaire d'amélioration de la tolérance au déficit hydrique (Fleury <i>et al</i> , 2010).	06
Figure 2. Mécanisme de réponse des plantes à la sécheresse et les caractères impliqués dans la réponse (De Leonardis <i>et al.</i> , 2010).....	10
Figure 3. Voie de la dégradation des protéines dans le cytosol par l'ubiquitine	16
Figure 4. Voies dépendante et indépendante de l'ABA de la réponse des plantes à la sécheresse (Shinozaki and Yamagushi-shinozaki, 2006)...	18
Figure 5. Les voies de la biosynthèse de la proline chez les plantes (Buchanan <i>et al.</i> ,2003)	22
Figure 6. Métabolisme et régulation du GABA-Shunt (Bouché et Fromm, 2004)	23
Figure 7. Disposition des variétés étudiées dans la chambre de culture)	28
Figure 8. Les principales phases d'amplification de l'ADNc par la RT-PCR (Newton et Graham, 1994)	33
Figure 9. Variation de l'humidité du sol des trois traitements de stress hydrique imposés (95% humidité = IR = irrigué ; 40% humidité = S1= stress modéré ; S2 = 20% d'humidité = stress sévère).....	39
Figure 10. Variation de l'humidité du sol cultivé en orge, variétés Tichedrett, Fouara et Nuré et en blé dur, cultivar Ofanto, sous stress hydrique modéré de 40% (les barres indiquent l'erreur standard).....	40
Figure 11. Variation de l'humidité du sol cultivé en orge, variétés Tichedrett, Fouara et Nuré et en blé dur, cultivar Ofanto, sous stress hydrique sévère de 20% (les barres indiquent l'erreur standard).....	41
Figure 12. Evolution de la longueur cumulée du feuillage du brin-maître des différents génotypes en absence de stress hydrique (IR)	43

Figure 13. Réduction relative de la longueur cumulée du feuillage du brin-maître des différents génotypes sous stress hydrique modéré (S1) et sévère (S2)	44
Figure 14. Evolution de la surface foliaire du brin-maître des différents génotypes en absent de la contrainte hydrique (IR).....	45
Figure 15. Réduction relative de la surface foliaire du brin-maître des différents génotypes sous stress hydrique modéré (S1) et sévère (S2), comparativement à l'irrigué (IR), à la fin de l'expérience	46
Figure 16. Evolution de la biomasse aérienne par pot des différents génotypes en absence de stress (IR), sous stress hydrique modéré (S1) et sévère (S2), à la fin de l'expérience	47
Figure 17. Réduction relative de la biomasse aérienne par pot des différents génotypes sous stress hydrique modéré (S1) et sévère (S2), comparativement à l'irrigué (IR), à la fin de l'expérience	48
Figure 18. Expression des gènes <i>Cbf</i> chez le cultivar Ofanto (A= 3 ^{ème} feuille soumise à un choc hydrique ou à une déshydratation lente ; B= les racines au stade 3f, la feuille au stade gonflement, les glumes au stade grain laiteux et de la graine au stade grain pâteux)	53
Figure 19. Expression des <i>Cbf</i> de la feuille étendard des variétés de blé dur Ofanto, Creso et de Trinakria en absence (T0) et en présence du déficit hydrique (T3)	54
Figure 20. Expression des <i>HvCBF</i> des tissus foliaires de l'orge (1 [°] F= une semaine après le semis; IRR= 95% CCP; S1 = 4% CCP, S2 = 20% CCP)	56
Figure 21. Expression des <i>WRKY</i> dans le tissu foliaire de l'orge (1 ^{ière} F, récoltée une semaine après le semis; IRR = 95% CCP; S1= 40%CCP et S2 = 20%CCP)	58
Figure 22. Expression du gène <i>6G2</i> dans le tissu foliaire de trois cultivars d'orge (1 [°] F: 1 ^{ière} feuille une semaine après le semis; IRR = 95% CCP, S1 = 40% CCP, S2= 20% CCP. ND: Non Déterminé)	60

Figure 23. Expression des enzymes impliquées dans le *Gaba-Shunt*, dans le tissu foliaire de trois cultivars d'orge (1°F: 1^{ière} feuille une semaine après le semis; IRR = 95% CCP, S1 = 40% CCP, S2= 20% CCP)**61**

Figure 24. Expression du *P5CS* (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase) et de l'Ornithine δ -aminotransférase dans le tissu foliaire de trois cultivars d'orge (1°F: 1^{ière} feuille une semaine après le semis; IRR = 95% CCP, S1 = 40% CCP, S2= 20% CCP).....**63**

Figure 25. Analyse de l'expression du gène *DHN8* dans le tissu foliaire de trois cultivars d'orge ((1°F: 1^{ière} feuille une semaine après le semis; IRR = 95% CCP, S1 = 40% CCP, S2= 20% CCP)**64**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les Mécanismes d'adaptation au stress (belhassen, 1996). **08**

Tableau 2. Réactifs utilisés dans la réaction d'amplification du cDNA avec les amorces de l'actine **34**

Tableau 3. Séquences des couples d'amorces des gènes spécifiques utilisés sur blé dur pour l'analyse RT-PCR ainsi que la taille de l'amplicon correspondant. Les amorces des *Cbf12* et *Cbf18* n'ont pas données un produit d'amplification en RT-PCR **36**

Tableau 4. Séquences des couples d'amorces des gènes spécifiques utilisés sur orge pour l'analyse RT-PCR ainsi que la taille de l'amplicon correspondant, les signes +/- désignent la présence /absence de l'amplification **37**

INTRODUCTION

Au cours de leur cycle végétatif, les plantes subissent les conditions du milieu ambiant dans lequel elles vivent. Elles réagissent en s'adaptant à la variation de ces conditions lorsqu'elles deviennent défavorables. La variation des conditions de croissance a pour origine les stress qui sont de nature biotiques ou abiotiques. Dans les milieux arides et semi-arides les stress abiotiques imposent des limites au développement de la plante. La résistance à ces stress est dépendante du génotype qui développe des mécanismes morphologiques, physiologiques et/ou biochimiques pour échapper (esquiver), éviter ou tolérer la contrainte (Levitt, 1982).

Les stress imposent le plus souvent une diminution de la croissance accompagnée, au niveau cellulaire, d'une diminution du nombre de polysomes, d'un ajustement osmotique, d'une modification de l'extensibilité des parois et d'une altération des métabolismes carboné et azoté. Cette diminution est suivie par une réduction de la photosynthèse due à l'accumulation de l'ABA, à la fermeture des stomates et aux dommages causés aux thylakoïdes (Wakabayashi *et al.*, 1997 ; Tardieu *et al.*, 2000 ; Lizana *et al.*, 2006 ; Martinez *et al.*, 2007).

Cette réduction de l'activité photosynthétique induit le plus souvent une réduction de la production économique (Condon *et al.*, 2002). De ce fait l'amélioration de la résistance aux stress abiotiques a été depuis longtemps un des principaux objectifs de l'amélioration des plantes. De nombreuses études ont été conduites pour mieux comprendre les mécanismes impliqués et identifier les caractères qui peuvent être utilisés comme critères de sélection de la tolérance (Sinclair and Venables, 1983 ; Blum *et al.*, 1996 ; Bajji *et al.*, 2001 ; Richards *et al.*, 2010 ; Fleury *et al.*, 2010).

Ces études ont permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes impliqués dans la tolérance (Cushman *et al.*, 1989; Cattivelli *et al.*, 2002 ;

Buitink et Leprince, 2008), où l'accumulation des protéines LEA et des HSP apparaissent comme des facteurs communs. La fonction des gènes, qui sous-tendent ces mécanismes et qui s'expriment différemment, au cours l'acquisition de la tolérance, n'est, cependant, pas entièrement élucidée (Rampino *et al.*, 2006).

Le nombre de gènes, codant pour des facteurs de transcription, dont l'expression varie en fonction de la tolérance, est élevé (Buitink *et al.*, 2006). Ainsi, entre autres, le mécanisme de fonctionnement de la protéine CRT (CalReTiculin), qui intervient dans la réponse des plantes aux stimuli des stress abiotiques et biotiques, reste à déterminer (Jaubert *et al.*, 2002 ; Sharma *et al.*, 2004 ; Jia *et al.*, 2008). Une meilleure connaissance du fonctionnement de ces gènes/protéines permet d'entrevoir la possibilité de leur utilisation en amélioration des plantes (Jia *et al.*, 2008).

En effet l'identification de variants alléliques des gènes semble, actuellement, retenir l'attention d'un grand nombre de laboratoires de recherche (Fleury *et al.*, 2010). Cette voie constitue une alternative séduisante et plus efficace pour sélectionner des génotypes tolérants les stress abiotiques et potentiellement plus productifs. Elle risque d'améliorer la relation entre le phénotype et le génotype, et de réduire la part de la variation qui est d'origine environnementale (Jia *et al.*, 2008 ; De Leonardis *et al.*, 2007; Fleury *et al.*, 2010).

Le stress induit une diversité de réponses qui résultent de l'expression génique et des modifications du métabolisme cellulaire, se traduisant par une variation de la croissance et du développement de la plante (Gilmour *et al.*, 1998). L'adaptation de la plante s'accompagne par une série complexe de réactions enzymatiques conduisant à l'évitement ou à la réduction des dommages susceptibles d'être causés, par le stress, à la cellule, et par là même à la plante entière (Cattivelli *et al.*, 2002). La cascade de réactions moléculaires se déclenche dès que la cellule perçoit le stress (Vinocur et Altman, 2005). Le signal de perception du stress

diffuse dans le cytoplasme et le noyau pour activer l'expression des gènes et des métabolites spécifiques.

Les gènes impliqués dans la réponse à la contrainte abiotique, qu'ils soient induits ou réprimés, codent pour une large gamme de protéines assurant diverses fonctions. Parmi ces fonctions, il y a la stimulation et la régulation du signal de transduction, la régulation de l'expression des gènes induits directement dans la réponse au stress, la protection et le maintien des fonctions et structures cellulaires. Toutes ces fonctions conduisent vers l'amélioration de la tolérance vis-à-vis des stress abiotiques (Vinocur et Altman, 2005 ; De Leornadis *et al.*, 2010). La présente contribution a pour objectifs d'étudier la réponse et d'analyser l'expression des gènes induits par la contrainte hydrique chez des plantules de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et d'orge (*Hordeum vulgare* L.), sous conditions contrôlées.

CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. APPROCHES DE LA TOLERANCE AU DEFICIT HYDRIQUE

La tolérance au déficit hydrique est définie comme étant la capacité de la plante à survivre, croître et produire de manière satisfaisante sous conditions limitantes en humidité (Tardieu, 2004). La tolérance au déficit hydrique est un caractère dont le phénotype et le contrôle génétique sont complexes (Tardieu, 2004 ; Shinozaki et Yamagushi-shinozaki, 2007). Une meilleure compréhension des mécanismes génétiques, qui sont à la base de la tolérance à la sécheresse, chez les plantes, est nécessaire pour développer des variétés plus adaptées et performantes (Rebetzke *et al.*, 2008).

De manière générale, l'amélioration de la tolérance des blés dur (*Triticum durum* Desf.) et tendre (*Triticum aestivum* L.) à la contrainte hydrique se fait selon trois approches. La première approche et qui est la plus utilisée, est l'approche empirique. Dans cette approche le rendement grain, sous stress, est le critère de sélection. Elle est relativement efficace, dans la mesure où la plus part des variétés tolérantes actuellement connues ont été sélectionnée par cette approche (Benmahammed *et al.*, 2010). Cependant, les cultivars tolérants sélectionnés par cette approche présentent le plus souvent un rendement faible, en milieux favorables, ce qui limite le gain de rendement (Tester et Langridge, 2010).

La seconde approche se base sur la variation de la physiologie de la plante en présence et en absence de la contrainte hydrique (Richards *et al.*, 2010). Plusieurs critères physiologiques tels que la teneur relative en eau, l'intégrité cellulaire, la perte d'eau foliaire, le contenu en proline, le contenu en sucres solubles, la translocation des assimilats, la discrimination isotopique du carbone, l'utilisation des indices de tolérances ont été proposées comme caractères liés à la tolérance (Adjabi *et al.*, 2007 ; Rebetzke *et al.*, 2008 ; Reynolds *et al.*, 2010 ; Benmahammed

et al., 2010 ; Richards *et al.*, 2010). L'utilisation des caractères préconisés par cette approche, dans les programmes de sélection, est très limitée, suite à la lourdeur de leur mise en œuvre sur des centaines de lignées en ségrégation (Richards *et al.*, 2010).

La troisième approche est relativement la plus récente et la plus étudiée actuellement, elle repose sur l'utilisation des marqueurs moléculaires. Gupta *et al.*, (2010) mentionnent que cette approche n'a pas encore identifié des génotypes tolérants le déficit hydrique et directement utilisables par la grande culture ; mais que des QTL (Quantitative Trait Loci) liés à la tolérance au bore et à la tolérance à l'aluminium, ont permis de sélectionner des génotypes tolérants produisant plus en présence du bore ou de l'aluminium. Dans ce contexte Fleury *et al.*, (2010) propose une approche multidisciplinaire associant améliorateurs, physiologistes et spécialistes en biologie moléculaire, pour affronter ce complexe problème de la sélection pour la tolérance au déficit hydrique (Figure 1).

L'amélioration de la tolérance à la sécheresse est compliquée aussi par le fait que la plante confronte non pas un stress mais des stress. La réponse de la plante est, donc, la résultante des réponses à divers stress. Il est difficile de faire la part de l'effet individuel de chaque stress (Chaves *et al.*, 2003). De plus, au niveau moléculaire, plusieurs voies de signalisation et des réseaux géniques sont relativement similaires chez plusieurs types de stress. Ainsi les gènes induits sous stress hydrique sont, en partie, observés sous stress salin ou sous stress du froid ou des hautes températures (Shinozaki et Yamaguchi-shinozaki, 2007).

La complexité du phénomène de la tolérance à la sécheresse, vient aussi du fait que, physiologiquement, certains mécanismes s'opposent et qu'il faut chercher un juste milieu qui soit favorable au rendement économique sous stress. Ainsi favoriser la fermeture rapide des stomates, en réponse au stress hydrique, aide à maintenir la turgescence foliaire et, par là même, l'activité photosynthétique (Chaves *et al.*, 2003). Cependant

cette stratégie, en supprimant ou réduisant l'effet rafraîchissant de la transpiration, rend la plante plus sensible au stress thermique. Dans les milieux semi-arides, les deux stress se chevauchent et rendent plus complexe la recherche d'une tolérance globale, qui est la résultante de l'interaction entre les deux types de stress (Rizhski *et al.*, 2004).

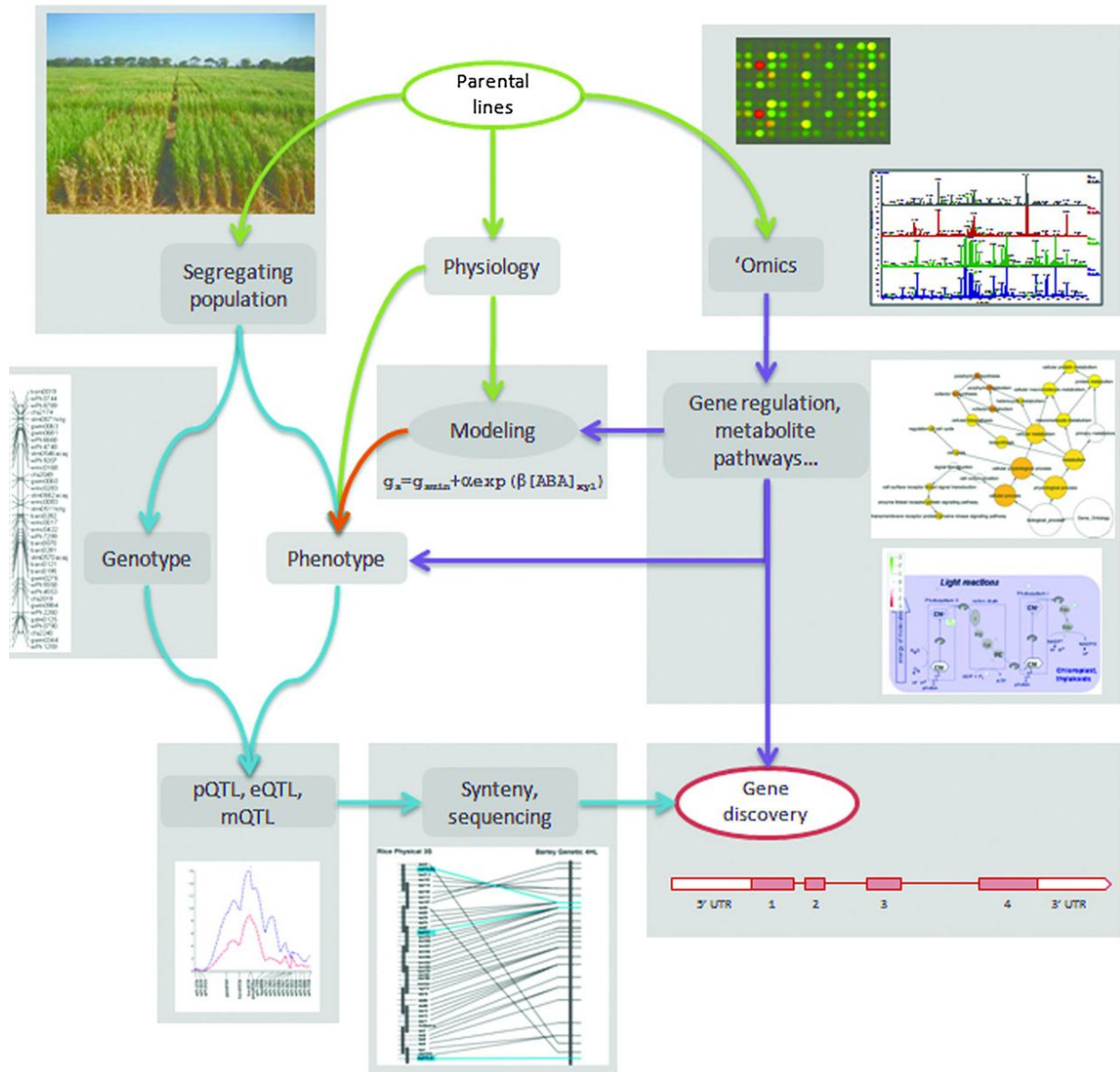


Figure. 1. Schéma intégré des approches empirique, physiologique et moléculaire d'amélioration de la tolérance au déficit hydrique (Fleury *et al.*, 2010).

L'utilisation des outils de la génomique fournissent des données utiles sur la variation de l'expression des gènes, des profils d'expression des protéines et des métabolites, en réponse à la contrainte hydrique. Ainsi Shinozaki et Yamagushi-Shinozaki (2007) notent une similitude d'expression entre les gènes induits par le stress hydrique chez l'arabette et le riz. Cette similitude concerne la cascade des signaux de transduction, l'activation et la régulation de la transcription, la protection fonctionnelle des protéines LEA (Late_Embryogenesis Abundant proteins), des protéines chaperonnes HSP (Heat Shock Proteins) et l'accumulation des osmolytes telles que la proline, la glycine-bétaïne et le tréhalose.

Cette similitude suggère que les mécanismes qui sous-tendent la tolérance sont les mêmes chez les différentes espèces. L'expression de ces gènes reste, toutefois, dépendante du génotype utilisé, de l'intensité et la durée du stress mises en œuvre et de la nature du stress (Ergen *et al.*, 2009). La comparaison des profils d'expression des transcrits des génotypes connus comme étant tolérants et ceux qui se montrent sensibles à la contrainte hydrique, montre de grandes différences d'expression.

Ainsi Mohammadi *et al.*, (2008) identifient un gène dans les racines d'un cultivar de blé tendre connu pour son échappement à la sécheresse. Ce gène ne s'exprime pas chez le cultivar sensible. Les deux génotypes diffèrent pour l'activité photosynthétique et la teneur relative en eau, sous la contrainte hydrique. De plus, physiologiquement, le cultivar tolérant montre une intégrité cellulaire élevée, un faible taux de perte d'eau cuticulaire, de longues racines et un ratio racine/tige élevé.

2. LA REPONSE PHYSIOLOGIQUE AU DEFICIT HYDRIQUE

Le stress hydrique provoque une multitude d'effets sur l'intégrité des fonctions cellulaires de la plante telles que la réduction de l'élongation des cellules et de la division cellulaire, qui induisent une diminution la surface foliaire photosynthétique (Granier *et al.*, 2000). Il y a

augmentation de la rigidité des parois cellulaires (Cosgrove, 2005) et une diminution de la turgescence (Bouchabke *et al.*, 2006). Pour maintenir son statut hydrique fonctionnel, la plante met en jeu de nombreux mécanismes. La transpiration est réduite grâce à la fermeture des stomates.

Le signal déclenchant le contrôle stomatique est initié par l'accumulation de l'hormone végétale, l'acide Abscissique (ABA). Cette hormone est synthétisée au niveau des racines, organes qui perçoivent le stress hydrique, puis elle est véhiculée vers les feuilles (Tardieu et Davies, 1993 ; Borel *et al.*, 2001).

La fermeture des stomatiques provoque une augmentation de la température foliaire et une réduction de l'assimilation du CO₂ d'où une réduction de l'activité photosynthétique, conduisant à de faibles performances (Chaves *et al.*, 2009). Différentes modifications morphologiques, physiologiques et biochimiques sont mises en jeu dans les mécanismes d'adaptation de la plante au déficit hydrique (Tableau 1 et Figure 2).

Parmi ces modifications, il y a l'ajustement osmotique qui permet à la plante, subissant le stress hydrique, de ne pas perdre sa turgescence et de ce fait de continuer ses activités métaboliques et survivre à la contrainte (Triboulot *et al.*, 2007 ; De Leonardis *et al.*, 2010).

L'ajustement osmotique résulte de l'augmentation nette des solutés présents dans la cellule. Ceci induit la diminution du ψ_s , avec une baisse de la valeur du ψ_w de la racine par rapport à celui du sol, permettant à l'eau de circuler du sol vers la plante selon un gradient potentiel bien déterminé (Abebe *et al.*, 2003).

L'adaptation osmotique entraîne des changements métaboliques qui altèrent le taux d'absorption ionique et la synthèse des composés organiques de faibles poids moléculaires. L'ajustement génère

l'accumulation de solutés ou osmolytes compatibles tels que la proline, la glycine-bétaïne, le mannitol, et les sucres, principalement, le glucose et le fructose (Umezawa *et al.*, 2006).

Tableau 1. Les mécanismes d'adaptation aux stress (Belhassen, 1996)

Mécanismes	Paramètres
- <i>Esquive du stress hydrique</i>	précocité
- <i>Évitement du stress hydrique</i>	longueurs et densité des racines
1- amélioration de l'absorption d'eau	profondeur de l'enracinement Ratio MSracine/MS bio aérienne
2- réduction des pertes d'eau	enroulement foliaire Port et orientation des feuilles couleur du feuillage Glauescence Pilosité des feuilles feuilles cireuses
3- maintien de la turgescence	Potentiel hydrique foliaire stable Contrôle stomatique des pertes d'eau
- <i>La tolérance du stress hydrique</i>	
1- Remobilisation des assimilats	hauteur de chaume longueur du pédoncule de l'épi longueur des barbes indice de récolte élevé
2- ajustement osmotique	stabilité membranaire accumulation des solutés compatibles maintien de la turgescence élevée potentiel hydrique faible
3- Maintien de la photosynthèse	teneur en chlorophylle a et b résistance des photo-systèmes fluorescence chlorophyllienne
4- efficacité d'utilisation de l'eau	nombre de grains par unité de surface discrimination isotopique du carbone

Les solutés compatibles sont des composés organiques hautement solubles qui ne sont toxiques pour la cellule à de fortes concentrations et qui n'interfèrent pas avec le métabolisme cellulaire mais maintiennent l'équilibre osmotique entre les divers compartiments cellulaires, ils jouent le rôle d'osmoprotecteurs (Umezawa *et al.*, 2006). Par contre les ions inorganiques, à de fortes concentrations, influent négativement sur les

processus métaboliques, en se liant à d'autres molécules comme les cofacteurs et les substrats, changeant les propriétés fonctionnelles des enzymes (Benderradji *et al.*, 2011).

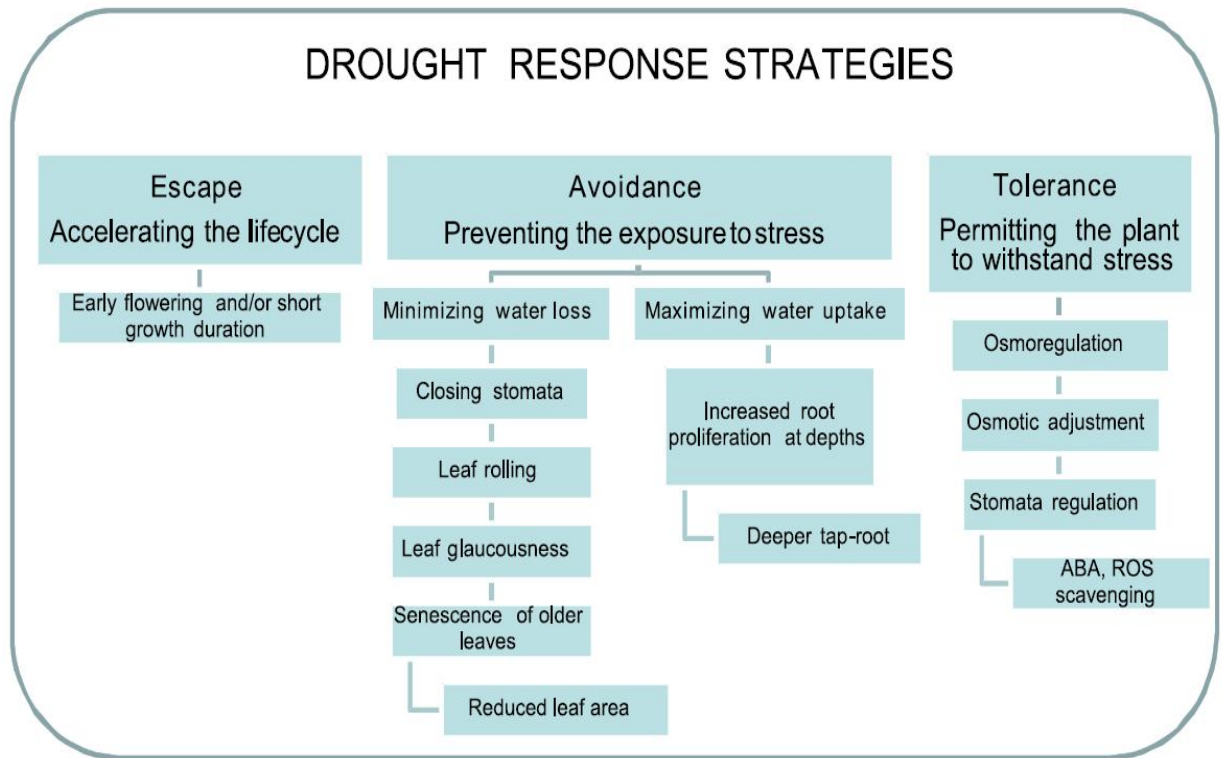


Figure 2. Mécanisme de réponse des plantes à la sécheresse et les caractères impliqués dans la réponse (De Leonardis *et al.*, 2010)

3. LA REPONSE MOLECULAIRE AU DEFICIT HYDRIQUE

La biologie moléculaire propose des outils pour l'étude de l'expression des gènes et des protéines. La génomique fonctionnelle s'intéresse à l'ensemble des transcrits et des protéines. Elle étudie les méthodes d'analyse de l'expression des gènes et des protéines. En comparant l'expression des gènes et /ou des protéines, au sein d'un même organisme et sous diverses conditions de croissance, il est possible de prédire le fonctionnement des gènes induits (De Leonardis *et al.*, 2007.). Ces informations sont fournies par l'analyse des variations d'expression

entre différents états physiologiques, différents stades de développement et différents tissus (Neffar *et al.*, 2011).

Deux approches sont utilisées pour comprendre les mécanismes moléculaires de la tolérance des stress. La première consiste à étudier les enzymes impliqués dans des voies métaboliques particulières alors que la seconde cherche à identifier des gènes exprimés de manière différentielle chez des plantes conduites sous stress et en l'absence du stress. Ces approches ont permis d'identifier de nombreux gènes de fonctions connues (Mazzucotelli *et al.*, 2008).

La cascade d'événements moléculaires conduisant au développement de la tolérance au stress comporte

- la perception du signal de stress par les récepteurs de la membrane cellulaire qui captent les variations du milieu externe ;
- la transduction du signal du stress du cytoplasme vers le noyau cellulaire, suivie d'une cascade d'évènements matérialisés par l'accumulation transitoire des ions Ca^{++} , l'activation des protéines de type kinases, l'accumulation de l'ABA et la modification de la structure de la membrane plasmique ;
- l'activation, dans le noyau, des facteurs de transcription associés à l'expression des gènes de réponse au stress ; et
- l'expression des gènes du stress codant des protéines qui gèrent la situation de stress en réparant ou en maintenant l'homéostasie cellulaire (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002).

Les changements de l'expression génique qui se produisent au niveau cellulaire sont intégrés dans la réponse de la plante entière. L'importance et la rapidité de la réponse cellulaire au stress dépendent de la durée et de l'intensité du stress (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002).

3.1. MODIFICATIONS POST- TRANSCRIPTIONNELLES ET POST-TRADUCTIONNELLES

Les modifications post-transcriptionnelle et traductionnelle représentent les mécanismes de régulation (synthèse ou dégradation) des transcrits mRNA et des protéines des molécules cibles. Le mécanisme par lequel les plantes perçoivent le stress est moins bien connu. La nature et la localisation des détecteurs primaires (le système d'alerte) sont également inconnues bien que l'on pense qu'ils soient localisés au niveau de la membrane tout comme les autres récepteurs actuellement identifiés dont entre autres les récepteurs pour l'éthylène, lumière rouge et bleue, et le Ca^{2+} (Sanders *et al.*, 1999 ; Knight, 2000).

Parmi les processus cellulaires percepteurs de stress, les protéines trans-membranaires sont activées et fonctionnent en tant que canaux de transport du Ca^{2+} vers le cytosol. Ainsi la sécheresse et la salinité causent un influx de Ca^{++} dans le cytoplasme cellulaire (Sanders *et al.*, 1999 ; Knight, 2000). La liaison entre le flux du Ca^{++} et la réponse au stress a été démontrée à travers l'addition de Ca^{++} exogène aux cellules en culture où l'activation génique en réponse au stress se produit aussi en l'absence du stress (Knight *et al.*, 1999).

Il existe des évidences moléculaires de récepteurs histidine-kinase de la membrane. Chez l'arabette (*Arabidopsis thaliana*), il a été cloné un gène *AtHK* homologue du détecteur du système d'osmo- régulation SLN1 de la levure (Urao *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002). Ce récepteur régule les réactions de type HOG (High Osmolarity Glycerol) qui contrôlent l'accumulation du glycérol en réponse au stress osmotique. Les transcrits du récepteur *AtHK1* chez l'arabette s'accumulent surtout dans les racines en conditions de stress osmotique. La protéine *AtHK1* est capable de rendre inactifs les mutants SLN1 de la levure, défectueux dans la perception des altérations osmotiques qui réajustent la réponse HOG.

L'activation des protéines spécifiques à la perception des signaux du stress stimule le flux intracellulaire de messagers secondaires vers le noyau, où s'active la transcription des gènes spécifiques. De nombreux messagers chimiques ont été identifiés (Ca^{++} , Inositol 1, 4, 5 Phosphate (IP_3) et Inositol héraPhosphate (IP_6), les formes actives de l'oxygène (ROS), les dérivés des lipides et l'ABA. Le rôle prioritaire dans la traduction du signal est initié par l'activation des protéines kinases.

Il a été démontré que la cascade des protéines de type Mitogen Activate Phosphate Kinase (MAPK) est activée par de nombreux stress abiotiques (Ligterink et Hirt, 2001). Il s'agit des protéines activées suite à une double phosphorylation des résidus de tyrosine et de thréonine. Le passage réversible de l'état actif à l'état inactif déphosphoré des kinases permet la diffusion de l'information du signal en mode transitoire. Le fonctionnement des MAP kinases se fait sous forme de chaîne de phosphorylation comportant une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) qui phosphoryle une MAP kinase kinase (MAPKK) et cette dernière phosphoryle, à son tour, une MAP kinase.

L'accroissement de la concentration de Ca^{2+} contrôle la transduction du signal du stress grâce à des protéines activées, comme la calmoduline, les kinases- Ca^{++} dépendantes et les phosphatases régulatrices du Ca^{++} . L'accumulation du Ca^{++} sous stress est corrélée à l'activation des protéines de type calcium dependent protein Kinase (CDPKase) situées sur la membrane. Les CDPKase se caractérisent par un domaine catalytique dont l'activité kinase est spécifique aux résidus de la thréonine et de la sérine.

Deux gènes, *Atcdpk1* et *Atcdpk2*, codant pour les CDPKase, isolés chez l'arabette sont induits sous stress hydrique et salin (Urao *et al.*, 1994). *Atcdpk1* active le promoteur du gène *hva1* sans la présence d'aucun stimulus externe, c'est un régulateur de la réponse aux stress (Shen *et al.*, 1996). De nombreuses molécules sont impliquées dans la

transduction des signaux externes à la cellule, parmi celles-ci, l'ABA est considéré comme le messenger principal qui signale au noyau la perception du stress.

La perception du stress est suivie par l'activation dans le noyau des facteurs de transcription (TF) qui régulent l'expression des gènes responsifs au stress. Les facteurs de transcription, dits trans-éléments, sont des protéines régulatrices qui se positionnent près des régions promotrices des gènes cis- éléments qu'ils régulent. Les promoteurs sont des séquences d'ADN sur lesquelles sont fixés les cis- éléments reconnaissables par les TF et les cis- éléments, impliqués dans la réponse aux stress, ont été identifiés chez plusieurs espèces (Cattivelli *et al.*, 2002; Mastrangelo *et al.*, 2005 ; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Deux voies de régulation de l'activité de transcription existent en réponse aux stress hydrique et au froid. La voie ABA- dépendante, dont les gènes concernés sont régulés par l'accumulation de l'ABA durant le stress, et la voie ABA- indépendante dont les gènes concernés ne sont pas influencés par l'accumulation de l'ABA (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Abe *et al.*, 1997).

La dernière étape de la réponse moléculaire aux stress se traduit par l'expression des gènes spécifiques qui codent pour la synthèse des protéines impliquées directement dans la tolérance au stress. Ces gènes aux différentes fonctions sont induits ou réprimés par le stress (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2005).

Les gènes, induits sous stress hydrique, assurent la protection de la cellule contre l'effet du déficit hydrique, en produisant des protéines fonctionnelles, et régulent le signal de transduction en réponse au stress hydrique (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 1997; 2007). Ces protéines fonctionnelles, comme les enzymes de la biosynthèse des osmoprotecteurs et les protéines *LEA* (Late Embryogenesis Abundant), protègent les cellules de la déshydratation.

Parmi ces protéines fonctionnelles figurent aussi les enzymes de détoxification comme le glutathione S-transférase, le super-oxyde dismutase, l'ascorbate peroxidase et l'époxyde hydrolase qui protègent les cellules des effets négatifs des ROS induites par le stress hydrique (Ingram et Bartels, 1996; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002). Les gènes du stress, une fois induits, sont transcrits en mRNAs qui migrent du noyau vers le cytoplasme. Ces derniers transcrits sont traduits en protéines spécifiques au stress considéré dans le cytosol. La vitesse de la transcription et la quantité des protéines synthétisées sont déterminées par des facteurs dépendant des stimuli du milieu ambiant (Miller *et al.*, 2001).

La dégradation des protéines se fait par protéolyse. Les protéines ciblées sont marquées par l'ubiquitine, protéine hautement conservée au sein de toutes les plantes. L'ubiquitine se fixe à un résidu lysine et la protéine ciblée selon un processus enzymatique à trois étapes :

- l'activation de l'ubiquitine, en présence de l'ATP par l'intermédiaire d'une liaison covalente à l'enzyme *E1*,
- l'ubiquitine activée se lie à l'enzyme de conjugaison *E2*, et
- le transfert de l'ubiquitine à la protéine cible se fait en présence de l'enzyme ligase *E3* qui a un rôle dans l'identification des protéines ciblées qui sont transférées au protéasome pour la dégradation (Figure 3).

4. REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE EN REPOSE AU STRESS HYDRIQUE

4.1. FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Les facteurs de transcription représentent la boucle finale de la chaîne de transmission du signal, avant l'activation, proprement dite, des gènes spécifiques impliqués dans la réponse au stress. Les facteurs de transcription sont des protéines qui se lient aux éléments-*cis* du DNA, dans une position spécifique de manière orienter l'RNA-polymérase dans

la transcription des mRNA à partir de la séquence génomique correspondante. Les éléments *cis* sont localisés près du promoteur et constituent des sites de liaisons pour les facteurs de transcription nécessaires à l'initiation de la transcription (Lui *et al.*, 1999).

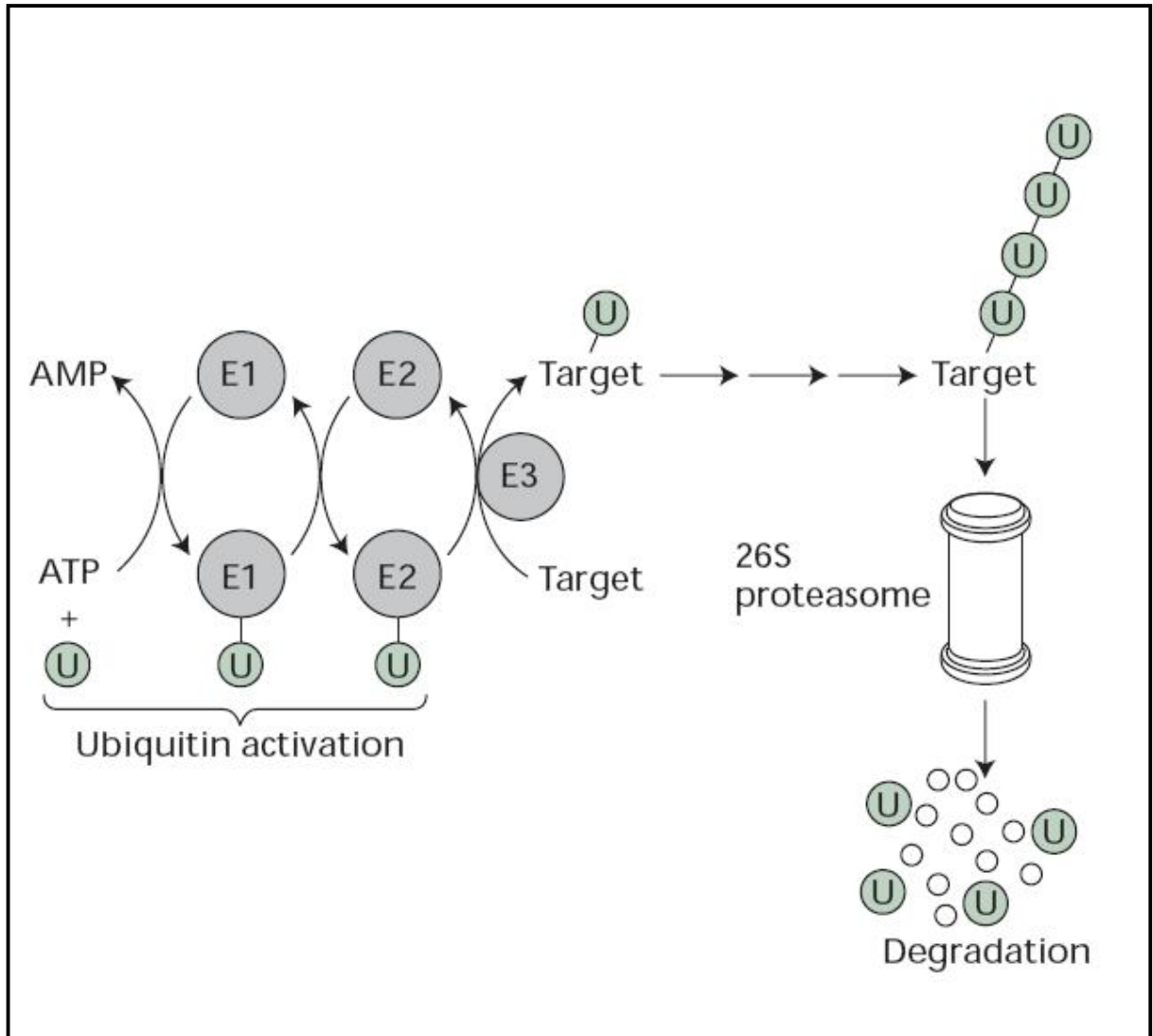


Figure 3. Voie de la dégradation des protéines dans le cytosol par l'ubiquitine

Le TFIID reconnaît une séquence spécifique à l'amont du site de liaison de la RNA-polymérase, la boîte TATA, grâce à la TATA-binding protein (TBP), à laquelle il se lie, formant un complexe d'activation la RNA-Polymérase_{II}. Le TFIIIE assure la réparation de l'ADN, alors que le TFIIH active la RNA-polymérase_{II} par phosphorylation (Lui *et al.*, 1999) (Figure

5). Un facteur de transcription type contient une région pour la liaison à l'ADN, un site d'oligomérisation, un domaine pour l'activation du RNA-polymérase et un signal de localisation nucléaire. Les domaines de liaisons des TF avec l'ADN sont remarquablement conservés au cours de l'évolution (Lui *et al.*, 1999).

4.2. LES VOIES ABA- DÉPENDANT ET ABA- INDEPENDANTE DES CBF/DREB

Des mutants de la biosynthèse de l'ABA sont utilisés pour montrer l'implication de cette hormone dans la réponse moléculaire au stress (Bray, 1997). En effet, chez le mutant *flacca* de la tomate, incapable de synthétiser l'ABA, quatre gènes induits par le stress ne s'expriment qu'après apport de l'ABA (Menkens *et al.*, 1995 ; De Leonardis *et al.*, 2010). L'accumulation de l'ABA active la transcription de ces gènes dont la région du promoteur se caractérise par la séquence 5'-PyACGTGGC-3' qualifiée de *ABRE* (ABA Responsive Element). L'élément ABRE a été identifié chez plusieurs espèces de plantes, et il est impliqué dans la détermination de la spécificité de liaisons de plusieurs protéines de la famille *bZIP*, telle que la *EmBP-1* qui est un TF (Menkens *et al.*, 1995).

L'étude des mutants ABA-déficient (*aba*) ou ABA-insensible (*abi*) chez *Arabidopsis* a montré que l'activation de certains gènes induits par le stress ne nécessite pas l'accumulation de l'ABA endogène (Ingram et Bartels, 1996; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Chez les mutants ABA- déficients, le gène *rd29A* (synonymes: *lti78* et *cor78*) est inductible sous stress et sous apport de l'ABA, ce qui suggère que *rd29A* n'exige pas nécessairement l'ABA pour son expression sous stress; *rd29A* est donc activé via deux voies: ABA -dépendante et ABA- indépendante (Thomashow, 1994; Ingram et Bartels, 1996; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Bray, 1997).

L'analyse fine du promoteur du gène *rd29A* a montré l'existence de deux éléments-*cis* qui agissent indépendamment l'un de l'autre. L'un est

constitué par *ABRE* qui répond à l'accumulation de l'ABA, et l'autre est une séquence conservée 5'- TACCGACAT-3', appelée Dehydration Responsive Element (DRE) qui régule l'induction du gène *rd29A* sous déficit hydrique et en absence d'ABA (Figure 4) (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007 ; De Leonardis *et al.*, 2010.).

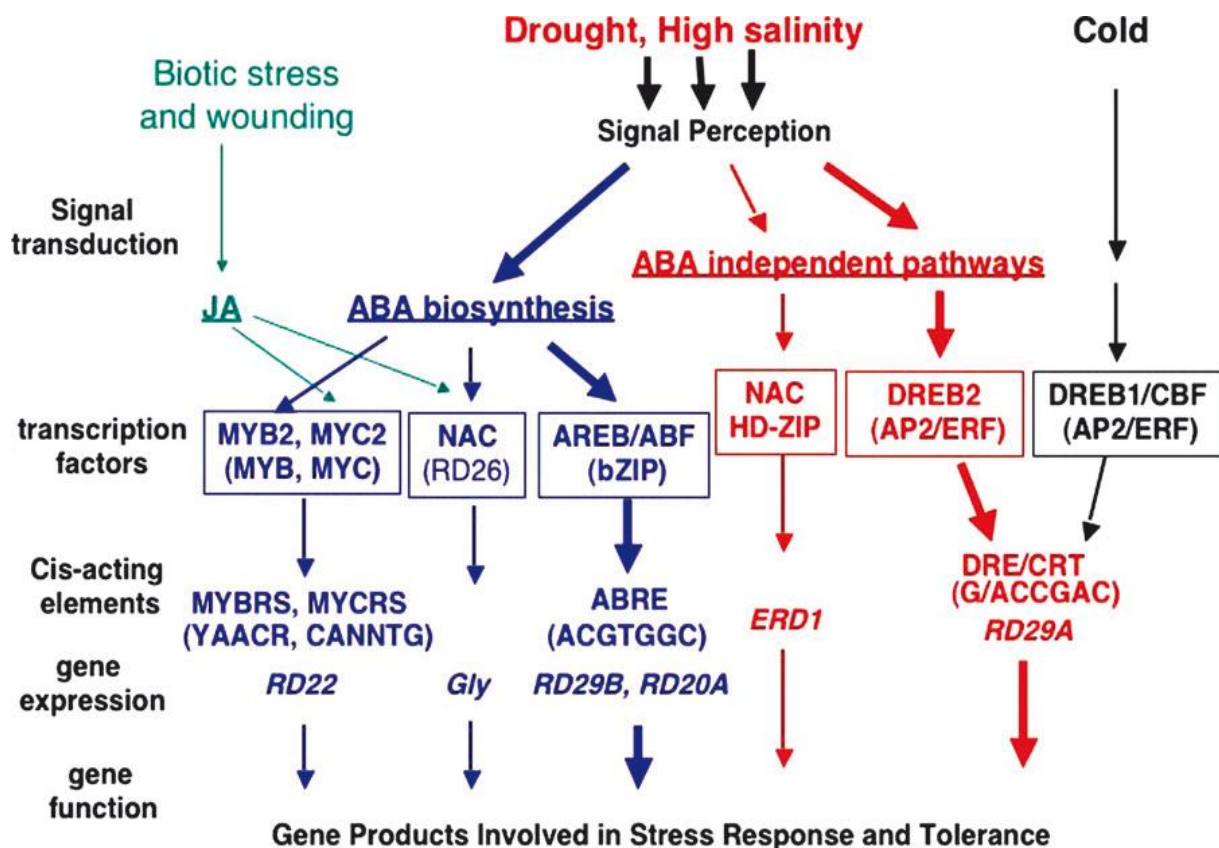


Figure 4. Voies dépendante et indépendante de l'ABA de la réponse des plantes à la sécheresse (Shinozaki and Yamagushi-shinozaki, 2006).

La séquence conservée 5'-CCGAC-3' est localisée près du promoteur de plusieurs gènes qui sont induits par le froid, en absence de l'ABA. Elle constitue le "core" des éléments- *cis* décrits comme Low-Temperature Responsive Element (LTRE) ou C-repeat (*CRT*) (Baker *et al.*, 1994). Le LTRE, indicateur de la réponse au stress thermique, est identique au DRE, indicateur de la réponse au stress hydrique (Gilmour *et al.*, 1998 ; De Leonardis *et al.*, 2010). L'utilisation des CRT comme appât dans un

système d'hybridation a permis d'isoler des activateurs transcriptionnels dits C-repeat binding factors (*CBF*) qui se lient au motif *CRT* sous stress thermique (Gilmour *et al.*, 1998; Stokinger *et al.*, 1997).

Sous stress hydrique, ces activateurs transcriptionnels sont dits DRE-binding protein (*DREB*). Comme *CBF* et *DREB* reconnaissent le même élément- *cis* et que la cible moléculaire est identique pour les deux, ils sont désignés *DREB*₁ dans le cas du froid (*CBF*) et *DREB*₂, dans le cas du stress hydrique (Liu *et al.*, 1998). La protéine domaine des *DREB* a été identifiée sur *APETALA2*, gène impliqué dans la morphogenèse de la fleur, et sur *EREBP* (Ethylene Responsive Element Binding Protein), gène induit en réponse à l'éthylène (Jofuku *et al.*, 1994).

La surexpression du *CBF1/DREB1b* ou du *CBF3/DREB1a* chez *Arabidopsis* induit, en absence de stress thermique, la tolérance et l'expression des gènes avec éléments *DRE/CRT* (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999). Les éléments *DRE/CRT* qui sont induits par des facteurs de transcription *DREB*, sont donc liés à des gènes contrôlant l'adaptation aux stress hydrique et/ou froid. En effet les facteurs *DREB* sont régulés par le stress et leurs transcrits sont présents à un faible niveau en conditions optimales de croissance, ils s'accumulent dès l'exposition au stress.

ICE1 (Inducer of *CBF* Expression 1) est un facteur de transcription qui est localisé en amont des facteurs *CBF*, dans la voie de la transduction du signal du stress (Chinnusamy *et al.* 2003). Il agit comme régulateur de l'expression du *CBF3* à travers un domaine bHLH MYC-like qui reconnaît les séquences consensus CANNTG. Sous froid, *ICE1* se lie au promoteur *CBF* et active la transcription. *ICE1* interagit avec l'enzyme E3 ligase *HOS1* (high expression of osmotically responsive gene 1) qui l'ubiquitinye et le dégrade par le protéasome (Dong *et al.*, 2006). *HOS1* est une protéine régulatrice de la réponse au froid; par ubiquitinylation de *ICE1*.

L'analyse génomique de divers espèces montre la présence des séquences “*DREB/CBF* like” suggérant que le mécanisme de la réponse aux stress abiotiques est un processus fortement conservé chez des espèces génétiquement très distantes (Mizoguchi *et al.*, 1996; Jaglo *et al.*, 2001; Jaglo *et al.*, 2001; Thomashow *et al.*, 2001; Xue, 2002; Choi *et al.*, 2002; Dubouzet *et al.*, 2003). Les *CBF/DREB1* sont portés par le chromosome 4 chez *Arabidopsis* (Gilmour *et al.*, 1998). Les espèces, transformées avec les séquences *DREB-CBF*, expriment la tolérance au stress auquel elles sont soumises.

4.3. LES WRKY

La famille de facteurs de transcription de type *WRKY* se caractérise par une séquence de 60 acides aminés hautement conservée. Le domaine *WRKY* contient une séquence fixe *WRKYGQK* suivie par *Cys₂His₂* ou *Cys₂HisCys* zinc-binding motif (Eulgem *et al.*, 2000). Ces protéines se lient spécifiquement à la séquence de l'élément-*cis* de type W-Box [(T)TGCA(C/T)] (Du et Chen, 2000). Soixante quatorze facteurs de transcription *WRKY* (*AtWRKY1* à *AtWRKY74*) ont été identifiés chez *Arabidopsis* (Eulgem *et al.* 2000).

Les facteurs *WRKY* ont été étudiés surtout dans la réponse génique aux maladies (Kim et Zhang, 2004; Dong *et al.*, 2003). Les *WRKY* sont également impliqués dans la réponse aux stress abiotiques (Marè *et al.*, 2004). Chez l'*Arabidopsis*, l'analyse des microarrays montre la présence des *WRKY* induite par la sécheresse, le froid, la salinité et les stress oxydatifs (Fowler & Thomashow, 2002; Seki *et al.*, 2002b; Vranova *et al.*, 2002, Rizhsky *et al.*, 2004).

4.4. EXPRESSION GENIQUE EN REPONSE AU STRESS HYDRIQUE: LES OSMOLYTES

Sous stress les plantes accumulent des osmolytes compatibles tels que la proline, le glutamate, le γ -acide aminé butyrique, la glycine-bétaine,

du mannitol, du sorbitol, du tréhalose et des déhydrines (Vinocur et Altman, 2005). Ces osmolytes jouent un rôle dans le maintien du métabolisme, en évitant la déshydratation cellulaire et en protégeant les structures membranaires (Close, 1996; Hinch et Hagemann, 2004; Mahajan et Tuteja, 2005). Des gènes impliqués dans la biosynthèse des osmolytes ont été clonés, notamment ceux contrôlant la biosynthèse de la proline (Wood *et al.*, 1996; Burnet *et al.*, 1995).

4.4.1. LA PROLINE

L'accumulation de la proline se fait surtout sous stress (Ober *et al.*, 1994). Elle joue un rôle d'osmoticum qui améliore la tolérance aux stress (Kauss, 1977). Cette accumulation régule du pH cytoplasmique (Pesci & Beffagna, 1984) et constitue une réserve d'azote utilisable par la plante en conditions de stress (Tal et Rosenthal, 1979). La proline est synthétisée selon deux voies distinctes, via le glutamate et l'ornithine (Figure 5). Dans la voie du glutamate, l'enzyme bi- fonctionnelle clef est la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase (*P5CS*).

La première réaction est catalysée par la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase par son activité γ -glutamate kinasique. Cette enzyme phosphoryle le glutamate en γ -glutamyl-phosphate, ce qui correspond à la première réaction de synthèse de la glutamine. La seconde réaction de la *P5CS* se fait par son activité GSA déshydrogénase NADPH- dépendante. La *P5CS* déphosphore le γ -glutamyl -phosphate en glutamate γ - semi aldéhyde. La troisième réaction est spontanée, ne faisant intervenir aucune enzyme: c'est la cyclisation du glutamate γ -semialdéhyde (GSA). Enfin, la *P5C* réductase (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate réductase), réduit le NADPH, H^+ et forme la L-proline.

La première voie de synthèse de la proline, à partir de l'ornithine, recycle l' Δ^1 -pyrroline-2-carboxylate (*P2C*) grâce à l'ornithine alpha amino-transférase et à la *P2C* réductase (Delauney et Verma, 1993). La seconde

voie enzymatique recycle l' Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) grâce à l'ornithine Δ amino-transférase et à la P5C réductase (Figure 5).

La surexpression du gène *P5CS* de *vigna aconitifolia*, chez les plantes transgéniques du tabac, induit une accumulation de la proline 10 à 18 fois plus élevée que celle mesurée chez le témoin. Cette accumulation se fait au détriment du glutamate, le précurseur de la P5C (Kavi Kishor *et al.*, 1995). Elle améliore la tolérance aux stress hydrique et salin (Kavi Kishor *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1998).

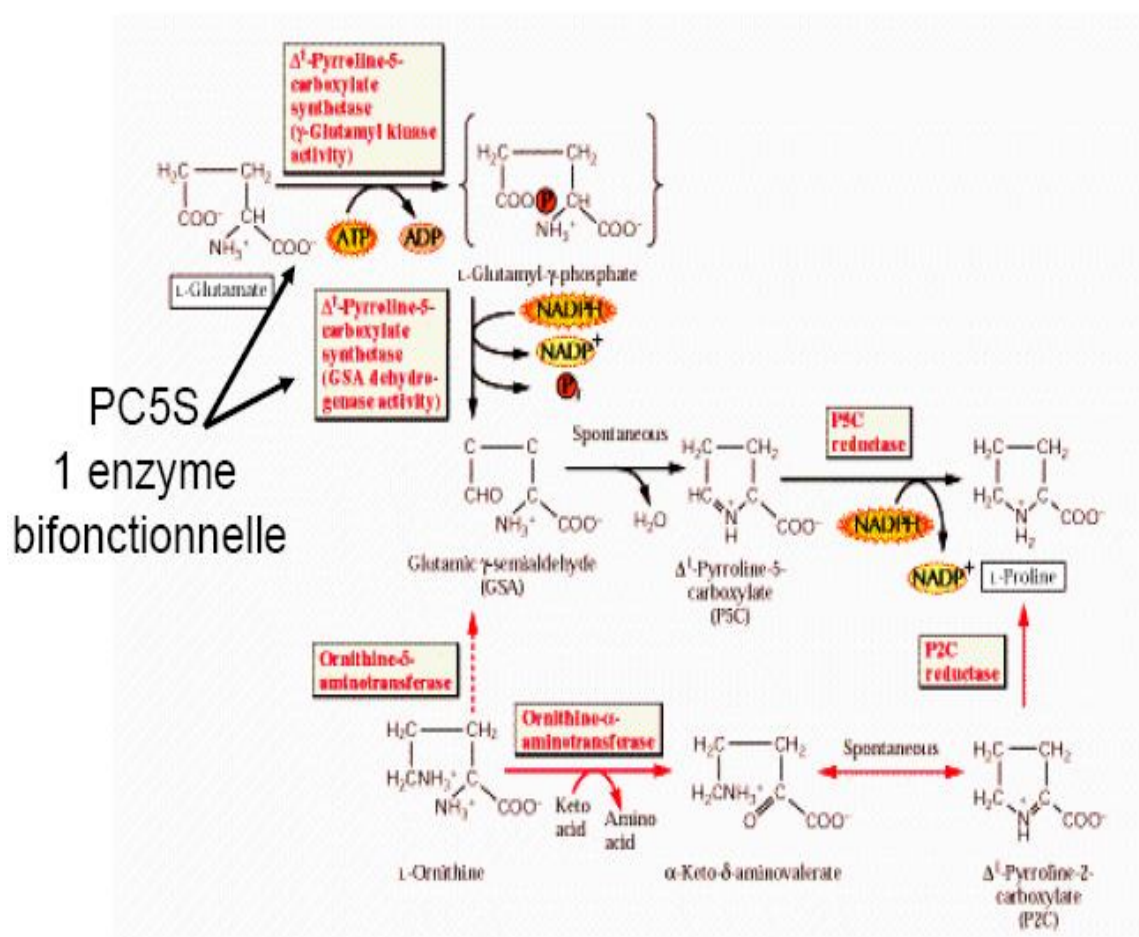


Figure 5. Les voies de la biosynthèse de la proline chez les plantes (Buchanan *et al.*, 2003).

4.4.2. GABA-SHUNT (Δ -ACIDE AMINE BUTYRIQUE)

Le Δ acide aminé butyrique (GABA) est synthétisé par la glutamate

décarboxylase (*GAD*), une enzyme localisée dans le cytosol. Le *GABA* est métabolisé par deux protéines mitochondriales du *GABA-shunt*, la *GABA* Transaminase (*GABA-T*) et la Semi Aldéhyde Succinique Déshydrogénase (*SSADH*), en deux étapes avant d'entrer le cycle de Krebs (Figure 6) (Snedden *et al.*, 1996).

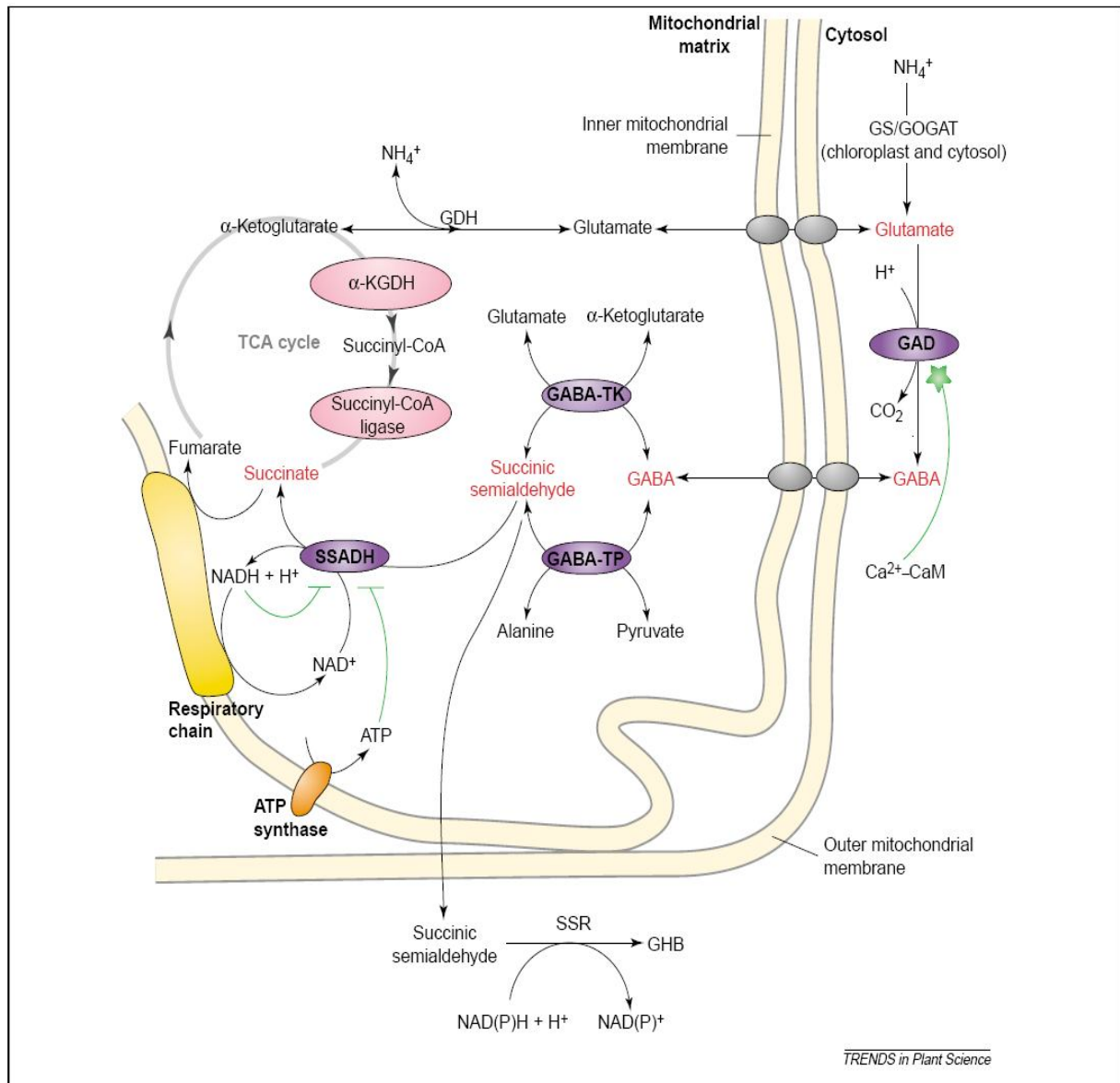


Figure 6. Métabolisme et régulation du *GABA-Shunt* (Bouché et Fromm, 2004).

La *GAD* est une enzyme calcium-calmoduline dépendante, elle s'active sous stress, en modifiant la concentration du Ca^{++} du cytosol et

induisant une augmentation du GABA (Baum *et al.*, 1993; Mazzucotelli *et al.*, 2006). Le SSADH est régulé par l'ATP et le NADH, ce qui suggère que le contrôle du GABA shunt dépend de l'énergie mitochondriale (Figure 6).

4.4.3. LES POLYPEPTIDES HYDROPHILES

Les déhydrines (*DHN*) font partie des protéines *LEA* (Late-Embryogenesis-Abundant), elles sont inductibles par la déshydratation (Close, 1997). Elles agissent comme chaperons dans la protection des protéines et des structures membranaires (Bravo *et al.*, 2003). Les déhydrines se caractérisent par une séquence conservée de 15 acides aminés, situés au voisinage du groupe carboxylique terminal, et une succession de résidus de Lysine. Les déhydrines basiques s'expriment durant la déshydratation, alors que les déhydrines acides sont impliquées dans l'acclimatation au froid.

Selon Danyluk *et al.*, (1998) l'accumulation de la déhydrine acide *WCOR410* près de la membrane, sous conditions de basses températures, est un signe d'implication de cette protéine dans le contrôle du processus de la cryo- protection des membranes. Le fraisier transgénique, qui surexprime le gène *WCOR410* de la déhydrine acide du blé, se montre tolérant aux basses températures (Houde *et al.*, 2004). La sur- expression du gène *hva1* chez le riz induit la résistance aux stress salin et hydrique (Xu *et al.*, 1996).

5. REGULATION POST-TRANSCRIPTION ET POST-TRADUCTION

La régulation de l'expression et de la régulation protéique a été, pendant longtemps, considérée comme une efficence de la transcription et de la traduction. La découverte récente des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle a mis en évidence l'existence de facteurs clefs dans le contrôle de la quantité des transcrits

et/ou des protéines qui régleraient le rapport synthèse/dégradation et la modification qualitative transcrit et/ou protéine (De Leonardis *et al.*, 2010). Les protéines peuvent être modifiées par addition de groupes chimiques et aussi par des liaisons covalentes à d'autres polypeptides. Un exemple de polypeptide modificateur est l'ubiquitine dont les modifications déterminent les protéines cibles à dégrader par le protéasome. La Small Ubiquitin-Related Modifier (*SUMO*) modifie, par des liaisons covalentes, de nombreuses protéines intervenant dans des processus tels que l'expression génique, la structure de la chromatine, le signal de transduction et la réparation de l'ADN. La machinerie enzymatique qui lie et détache *SUMO* est ressemblable celle de l'ubiquitinylation (Gill, 2004).

CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES

1. SITE ET MATERIEL VEGETAL

L'expérimentation a été conduite dans le laboratoire de l'Institut Expérimental de la Céréaliculture Italien située à Fiorenzuola d'Arda en au cours de la période 2006-2008. Le matériel végétal est constitué de trois variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et trois variétés d'orge (*Hordeum vulgare* L.) : Ofanto, Creso et Trinakria pour le blé dur, et Tichedrett, Fouara et Nuré pour l'orge.

Creso est une sélection italienne, datant de 1974, issue du croisement Yt₅₄-Norin₁₀-Brevor/2*Cp₆₃//3*TC₆₀/3/Cp/B₁₄, réalisé par l'ENEA (Agence Nationale pour les nouvelles technologies, l'énergie et l'environnement) (Maccaferri *et al.*, 2003). Cette variété s'est surtout distinguée par sa résistance à la rouille brune (*Puccinia recondita* Rob.) et elle utilisée comme source de gènes Lr de résistance (Goyeau *et al.*, 2010).

Trinakria est une variété italienne, datant de 1970, dont le croisement d'origine est B₁₄/Capeiti₈, réalisé par l'Institut Agronomique de Palerme (Ist. Agronomia Palermo) (Maccaferri *et al.*, 2003). Ofanto est une variété italienne, datant de 1990, sélectionnée du croisement Appulo/Adamello, réalisé par l'Institut Expérimental de la céréaliculture (Ist. Sper. Cerealicoltura). Cette variété a été testée, dans le cadre du programme de collaboration ITGC algérien/IAO, Italien, dans un vaste réseau national d'essais comparatifs de rendement en grain. Cette variété s'est classée parmi les plus performantes (Annichiarico *et al.*, 2005). Ce cultivar est réputé pour sa tolérance à la sécheresse (Maccaferri *et al.*, 2003)

Tichedrett et Fouara sont des variétés algériennes. Tichedrett est une variété à 6 rangs de type printemps, sélectionnée d'une population locale. Elle se distingue par une large adaptation aux hauts plateaux de l'Est (Kadi *et al.*, 2010). Fouara est une variété récente d'orge, sélectionnée

par la Station Expérimentale Agricole (SEA) de l'ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures) de Sétif vers le début des années quatre-vingt-dix. C'est une variété à 6 rangs, de type printemps, très productive et qui connaît une large adoption par les agriculteurs de l'Est Algérien (Benmahammed *et al.*, 2001). C'est une sélection du croisement Deir alla₁₀₆/Strain₂₀₅//Gerbel. ICB_{85.1376.0}_{AP.1}_{AP.2}_{AP}, réalisé par l'Icarda (International Center for Agricultural Research in Dry Aras). Nuré est une variété italienne d'orge à deux rangs, de type hiver, sélectionnée du croisement Fior₄₀/Apha²//Baraka par l'Institut Expérimental de la Céréaliculture, station de Fiorenzuola (Francia *et al.*, 2004).

2. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Cinq stades végétatifs sont ciblés pour l'étude physiologique et génomique de l'effet de la contrainte hydrique. Ces stades végétatifs sont 3 feuilles, épiaison, floraison, grain laiteux et grains pâteux. Pour le stade végétatif 3 feuilles, les graines sont mises à germer et se développent sur du papier Wattman, irriguées, en fonction du degré du stress ciblé avec une solution Hoagland. Pour les autres stades végétatifs cibles (épiaison, floraison, grain laiteux et grains pâteux), les graines sont semées dans des pots de végétation remplis avec un mélange de terre, de sable et de tourbe dans les proportions 6:3:1 (W/W).

Les graines empotées ainsi que celles mises à germer sur du papier Wattman sont placées dans une chambre de culture à 20°C/16°C, sous une photopériode de 9h/15h et une luminosité de 500 μ M m⁻²s⁻¹. Un dispositif à randomisation au hasard, à trois répétitions, est employé, avec deux facteurs étudiés : intensité du stress et génotypes. Les pots sont couverts par un film plastique blanc pour empêcher l'évaporation. Le film plastique est perforé pour laisser sortir la plantule, une seule par pot (Figure 7).

Après le stade de 3 feuilles, les conditions de croissance sont ajustées pour les plantes empotées pour reproduire, autant que possible,

les conditions de plein champ, en termes de température, humidité et longueur du jour. Les conditions de croissance varient de 10°C jour/7°C nuit, 60% d'humidité relative, 9h de lumière/15h d'obscurité, 500 μ M m⁻² s⁻¹ densité du flux des photons, au stade de la troisième feuille, à 25°C jour/20°C nuit, 45% d'humidité relative, 16h de lumière/8 h d'obscurité, 500 μ mol m⁻²s⁻¹ de densité du flux des photons au stade de grain pâteux. Sous ces conditions de croissance, les génotypes étudiés ont mis trois mois pour atteindre le stage maturité.

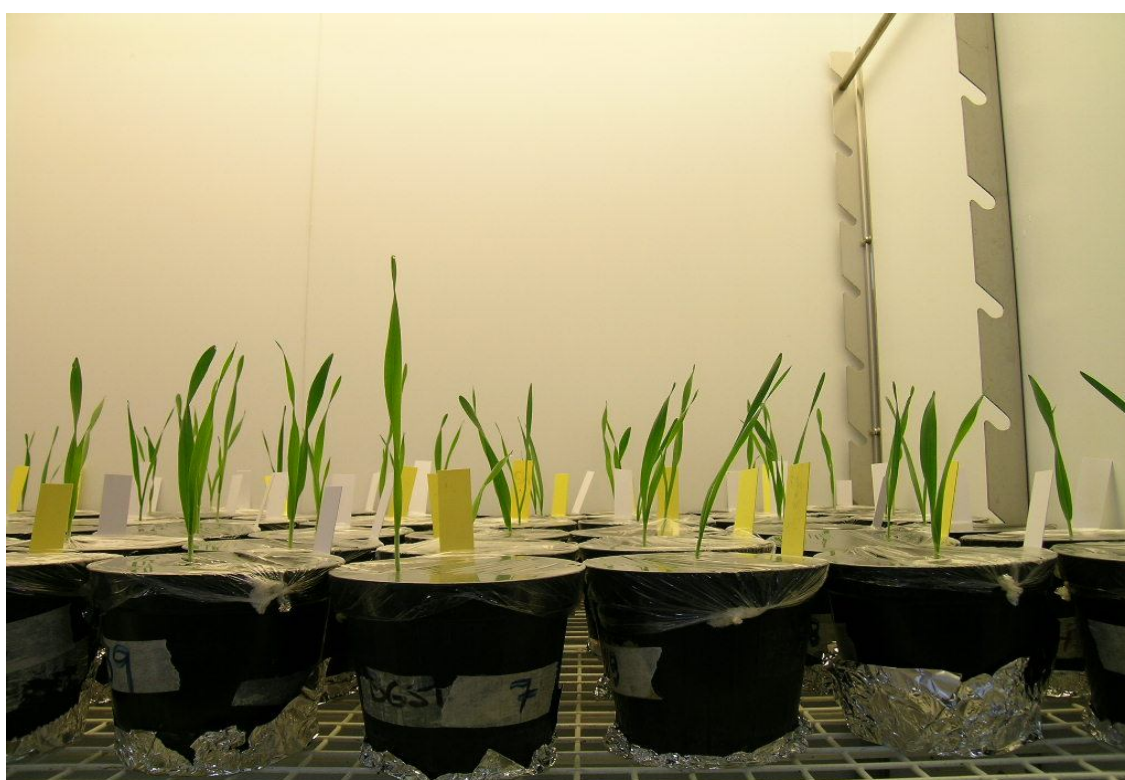


Figure 7. Disposition des variétés étudiées dans la chambre de culture

Au stade 3 feuilles, les plantules se développant sur du papier Wattman sont soumises à une déshydratation rapide, à l'air ambiant, après lavage à l'eau distillée et arrêt des apports de la solution nutritive. L'échantillonnage des feuilles et des racines de ces plantules, qui ont atteint le stade 3 feuilles, est fait lorsque le potentiel hydrique foliaire atteint les valeurs -1.5 et -1.75 MPa, respectivement. Ces seuils représentent des intensités de stress hydrique modéré (T₁) et sévère (T₂). Le contrôle (T₀) est représenté par des plantules continuellement irriguées

avec la solution nutritive et dont les racines et les feuilles sont échantillonnées au même moment que celles des traitements T_1 et T_2 . Le statut hydrique des plantes est réalisé avec une chambre de pression.

Les plantes conduites en pots de végétation sont, par contre, soumises à une déshydratation lente par arrêt de l'irrigation, au stade végétatif ciblé. Aux stades épiaison, floraison et grain laiteux et pâteux, la feuille drapeau est échantillonnée au moment où la valeur de son potentiel hydrique atteint -3.0 , et -3.2 MPa, respectivement pour les traitements T_1 et T_2 . Une fois ces seuils sont atteints, le stress est imposé pendant 4 jours, où l'humidité du sol est ramenée à 20.0, 40.0 et 95.0%, respectivement pour les traitements T_2 , T_1 et T_0 .

3. NOTATIONS

3.1. MORPHOLOGIE

Les mesures ont portées sur la détermination la biomasse accumulée et de la surface de la dernière feuille développée qui est estimée par le produit $0.75 (L \times l)$ où L représente la longueur de la feuille échantillonnée et l , sa plus grande largeur (Dacosta *et al.*, 2004).

3.2. QUANTIFICATION DES ARN

L'échantillonnage foliaire, pour l'analyse de l'expression génique, est réalisé une fois les différents traitements atteignent le seuil de stress hydrique prédéterminé (20, 40 et 95%). Les feuilles 6, 5 et 4 du maître brin sont échantillonnées à partir de deux répétitions. Elles sont enveloppées dans des feuilles d'aluminium, placées dans de l'azote liquide et puis gardées sous basses températures à -80°C au fin d'analyse. Le tissu végétal, conservé à -80°C , est moulu en fine poudre en présence de l'azote liquide pour éviter la dégradation des tissus et préserver les acides nucléiques.

La poudre végétale foliaire, récupérée dans des flacons, est stockée dans de l'azote liquide avant l'extraction des acides nucléiques. L'extraction des RNA est faite selon la méthode du TRIzol (Pang *et al.*, 2007). Pour ce faire 0.1mg de poudre végétale est mis dans un eppendorf de 1.5 ml, il est homogénéisé avec 1ml de réactif de TRIzol (Invitrogen) et incubé 10mn à température ambiante. On ajoute 0.2ml de chloroforme et le tout est agité vigoureusement pendant 15 secondes. Les eppendorfs, ainsi traités, sont incubés sous température ambiante pendant 2-3mn, avant de les centrifuger à 10000 g, sous basse température de 4°C pendant 10 minutes. La phase aqueuse est reprise dans d'autres eppendorfs, auxquels on ajoute 0.5ml d'Isopropanol. Le tout est bien mélangé, incubé à température ambiante pendant 10 minutes, puis centrifugé à 10000 g, sous basse température à 4°C pendant 10 minutes.

Le surnagent est rejeté et le culot est lavé avec 1ml d'éthanol à 75%, puis il est centrifugé à 10000 g sous basse température à 4°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont desséchés dans un dessiccateur à une température de 30°C pendant 10 minutes, pour éliminer l'excès d'éthanol. On rajoute aux échantillons 30 µl d'une solution constituée d'eau stérilisée additionnée de di-éthyl pyrocarbonate. Cette solution a une concentration de 1:1000, elle est incubée pendant 12 heures sous une température de 37°C, avant autoclavage. L'ajout de cette solution évite à l'ARN d'être dégradé par l'ARNase.

La solubilisation des échantillons est favorisée par des passages successifs au chaud et au froid dans un thermo bloc à 60°C pendant 10 minutes. La quantification des RNA est faite au spectrophotomètre de type Beckman DU 640, à des longueurs d'onde de 260nm pour les acides nucléiques, 280nm pour les protéines liés à des résidus aromatiques et 320nm pour l'effet résiduel.

3.3. SYNTHÈSE DE L'ADN_c

La synthèse du brin de l'ADN_c, complémentaire de l'ARN_m, est faite selon la procédure du Kit Promega*, sur des échantillons de 3µg de RNAt et 1µl Oligo-dT (0.5µg/µl) dilués dans de l'eau distillée, autoclavés pour un volume final de 14µl. Les micro tubes sont centrifugés et incubés à 70°C pendant 5 minutes pour dénaturer, étaler et aligner l'ARN_m et faciliter l'attache de l'enzyme de synthèse du brin de l'ADN_c. Ils sont mis rapidement dans de la glace fondante pendant 5 minutes pour préserver la forme acquise par l'ARN_m lors du réchauffement. La réaction de la transcription inverse est induite en utilisant l'enzyme M-MLVRT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase).

Pour ce faire, on ajoute à chaque échantillon 5µl de M-MLVRT 5X réaction buffer, 1.2µl de dNTPmix (10mM), et 1µl de M-MLV RT (H-) (200U) et on complète à 25µl avec de l'eau distillée. On homogénéise le mélange, on met 11µl de ce mélange dans chaque eppendorf et on centrifuge. Les échantillons sont entrés dans le thermocycleur pendant 10 minutes à 40°C pour l'accèsibilité des amorces à l'ARN_m, 50 minutes à 45°C pour l'entrée en action de la MMLV-RT et en fin 15 minutes à 70°C pour inactiver la RT. Les échantillons sont ensuite refroidis à 4°C.

La quantification de cDNA est faite avec le Qubit™ – Fluorometer en utilisant le kit Quant-it Assays (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>). Cet appareil mesure l'intensité de la fluorescence émise par le réactif fluorescent qui s'intercale dans la double hélice de l'ADN. Elle est proportionnelle à la quantité de l'acide nucléique présent dans la solution. Le temps de mesure est de 2 minutes pour permettre à l'appareil de piéger le maximum de fluorescence. Après ce laps de temps, le signal de fluorescence est stable pendant trois heures à température ambiante. La mesure est faite à température ambiante. Les réactifs, les solutions tampons, et les standards sont mis à température ambiante, une demi-heure avant la mesure.

La préparation de la solution de travail se fait par dilution du réactif du Quant-iT™ (1:200) dans le Quant-iT™ buffer, en ajoutant $199 * n \mu\text{l}$ de tampon Quant-iT™ à $1 * n \mu\text{l}$ de réactif Quant-iT™. Deux solutions standards sont confectionnées en ajoutant à $190 \mu\text{l}$ de la solution de travail $10 \mu\text{l}$ de la solution standard 1 et $10 \mu\text{l}$ de la solution standard 2 pour avoir un volume de $200 \mu\text{l}$. Pour $1 \mu\text{l}$ des échantillons on ajoute $199 \mu\text{l}$ de la solution de travail (n étant le nombre total de standards et d'échantillons). Les échantillons et standards sont homogénéisés, puis ils sont centrifugés (2-3 secondes), ensuite ils sont incubés pendant 2 minutes à température ambiante avant la lecture, exprimée en $\mu\text{g}/\text{ml}$, au Qubit™ Fluoromètre. Le calcul de la concentration en cDNA des échantillons est établi par la formule suivante:

$$\text{Concentration (ng}/\mu\text{l}) = (200\text{Qf})/\text{X}$$

où Qf est la valeur lue au Qubit™ Fluoromètre, et X est le nombre de μl utilisé par échantillon ($1 \mu\text{l}$). Les échantillons sont ramenés à une même concentration en ADNc, par dilution.

3.4. DEMULTIPLICATION DE L'ADNc

La démultiplication de l'ADN cloné à partir de l'ARNm transcrit est faite par la RT-PCR. La quantité d'ADNc obtenue est proportionnelle au nombre de cycles de démultiplication dans le thermocycleur. La réaction de polymérase en chaîne (PCR) permet d'amplifier le cDNA avec l'aide de la Taq polymérase. La cinétique de l'amplification comporte trois phases. La phase exponentielle, au cours de laquelle le produit issu d'un cycle d'amplification sert de matrice pour le cycle suivant, soit une accumulation exponentielle théorique de 2^n fois par molécule d'ADNc originale.

La phase linéaire au cours de laquelle la quantité de produit démultiplié atteint le stade linéaire, parce que la Taq polymérase devient peu disponible. La phase plateau représente les derniers cycles

d'amplification, à partir desquelles la démultiplication ralentit. Elle reflète une baisse de l'efficacité de la Taq polymérase et de la déficience des dNTP et des amorces, matériaux nécessaires à l'amplification (Figure 8).

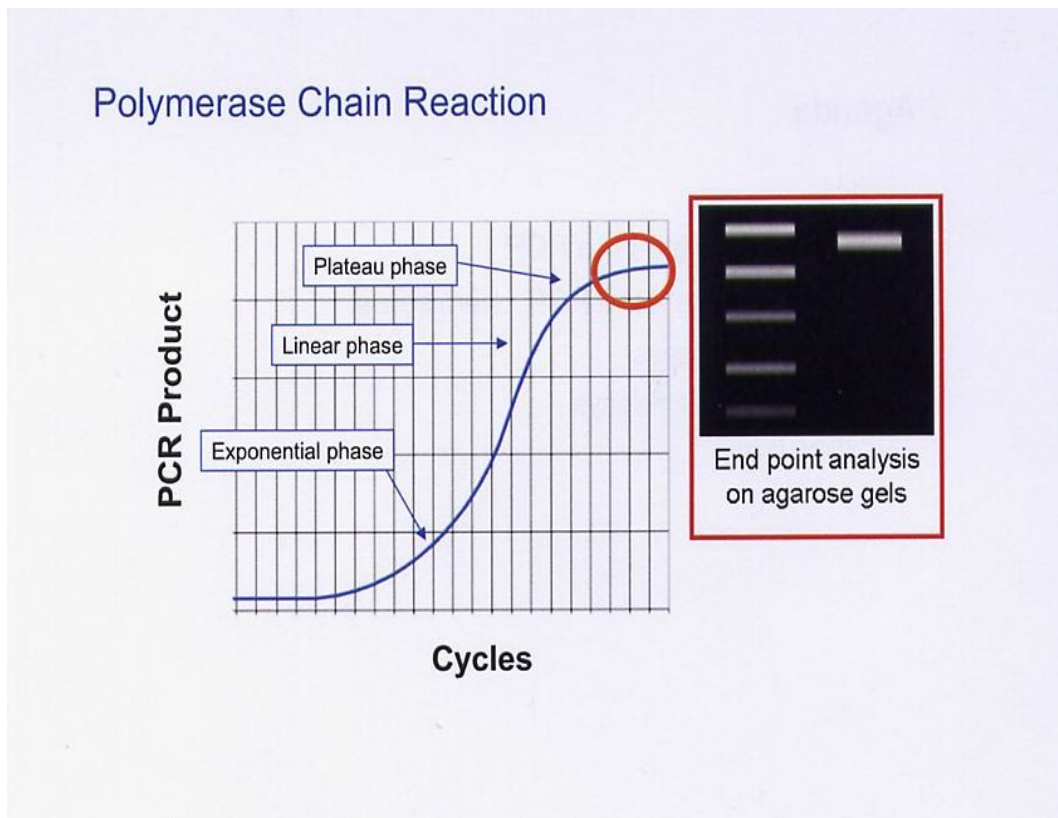


Figure 8. Les principales phases d'amplification de l'ADNc par la RT-PCR (Newton et Graham, 1994).

3.5. NORMALISATION DES ECHANTILLONS

Avant d'entamer l'expression génique, les échantillons sont normalisés avec un gène endogène, l'actine. L'actine permet de contrôler la variation de la concentration d'ADNc des échantillons, grâce à la visualisation de l'épaisseur de la bande d'amplification de l'actine. Pour ce faire, un mélange des séquences sens et anti-sens d'amorces spécifiques à l'actine avec les réactifs portés au tableau 2 est réalisé.

L'amplification est réalisée selon le programme thermique suivant, pendant 24 cycles:

- 95°C 3' Dénaturation

- 95°C 30" Dénaturation
- 60°C 30" Hybridation (Primers Annealing)
- 72°C 45" Elongation (Extension)
- 72°C 5' Elongation finale
- 4°C ∞

Il s'agit d'une première réaction de dénaturation de l'hybride cDNA/mRNA (95°C, 3'). Une phase d'appariement ou d'hybridation des amorces de DNA, (Oligo-nucléotides synthétiques complémentaires des deux extrémités de la région à amplifier), à leurs séquences complémentaires (60°C, 30"). Une réaction de polymérisation de l'enzyme Taq polymérase à 72°C x 45'. Une phase d'extension des produits amplifiés à 72°C x 5', grâce à l'activité de la Taq polymérase qui synthétise, à cette température, le brin complémentaire complètement étendu. On soumet l'ensemble des constituants indiqués au tableau 2, à trois réactions d'amplification qui se répètent : dénaturation, hybridation et élongation, durant 24 cycles.

Tableau 2. Réactifs utilisés dans la réaction d'amplification du cDNA avec les amorces de l'actine

Réactifs	Volume Initial	Concentration initiale	Concentration finale
PCR tampon	5 µl	5X	1X
MgCl ₂	1.5 µl	20mM	1.2mM
dNTP _{mix}	0.5 µl	10mM	0.2mM
Primer forward _{ACT}	1 µl	10 µM	0.4µM
Primer reverse _{ACT}	1µl	10µM	0.4µM
ADNc	1.5µl	2ng/µl	0.12ng/µl
Tag* Poly ADN	0.3µl	5U/ml	1U
H ₂ O	Xµl	Volume final 25µl	

*L'ADN polymérase thermo-résistante de la bactérie *Thermus aquaticus*

3.6. PREPARATION DU GEL D'AGAROSE

La préparation d'un litre de solution de gel d'agarose est réalisé avec 54.0g/l de TRIS, 27.5g/l d'acide borique et 20.0ml d'EDTA (0.56M, pH8), en plus du tampon TBE 5X. Une concentration de 0.5X est utilisée comme

solution tampon de la migration, en remplissant la cuve d'électrophorèse. La concentration du gel est fonction de la longueur du fragment de cDNA amplifié parce qu'il permet de visualiser et de discriminer les fragments de petites tailles du cDNA, et de les différencier entre eux. La solution est pesée et chauffée pour solubiliser la poudre d'agarose dans la solution tampon (TBE 0.5X). On rajoute du bromure d'éthidium (1µl/100ml), une molécule qui met en évidence l'ADN, en s'intercalant dans la double hélice de ce dernier, et devient fluorescente une fois exposée aux rayons UV à 320nm.

Sous la hotte, à température ambiante, on verse le gel liquide sur une plaque de migration après avoir placé un peigne pour permettre la formation des puits, après le refroidissement du gel, lieux de dépôts du produit amplifié. Le produit de la RT-PCR est mis dans les puits de gel, formés, après avoir placé ce dernier dans la cuve d'électrophorèse. Les fragments de DNA sont de longueur connue et attendue, et donc, lors de cette même migration sur gel, on y met un DNA marqueur de taille constitué d'une mixture de fragments de longueur connue pour pouvoir situer les fragments de cDNA amplifiés. Photographier le gel et visualiser le produit de la PCR aux rayons UV, à l'aide d'un GelDoc 1000 (Bio-Rad).

3.7. AMORCES TESTEES

Les amorces utilisées sur blé dur (Tableau 3) et sur orge (Tableau 4) sont de longueurs allant de 14 à 26 bases, et possédant 40 à 60% (C+G), il est nécessaire de faire attention que leurs séquences ne forment pas des structures secondaires entre-elles et que les séquences ne soient pas complémentaires pour éviter la formation de dimères des amorces. Les deux amorces (sens et anti-sens) doivent avoir une température d'hybridation similaire, dans le cas contraire; s'ils ont des températures d'annealing différentes, on opte, alors, pour la plus basse des deux. La température d'hybridation est spécifique, pour chaque couple d'amorces.

Tableau 3. Séquences des couples d'amorces des gènes spécifiques utilisés sur blé dur pour l'analyse RT-PCR ainsi que la taille de l'amplicon correspondant. Les amorces des *Cbf12* et *Cbf18* n'ont pas données un produit d'amplification en RT-PCR.

Gène	Amorces-Sens	Amorces anti-Sens	Taille
CBF ₂	TCGCTGTGGAGCTACTGGTTGGACG	TTGGTCCATGTCCATGGAGCGAATG	358
CBF ₃	GCGGTGGACACCGATATGTTTCAG	GCGAGGGGAATTATCGACTGTAC	199
CBF ₄	GGAGACGCAGACGCCGTTGTGGAG	TCTATTTGATTTGGATTCATGAC	ND
CBF ₅	CTTGGCGGACCTGGAACAGCATTC	GGAGGACTCAGGAGCAAACGAATCG	201
CBF ₉	AGATCATTCTTCCAGTCGCGTGCCTG	CGCTTCCCAAATCGAGAAGAAGGCG	277
CBF ₁₀	TGTTTCAGTAGGCTTGACTTGTTCCCG	GCAGAATCGGCTACAAGCTCCAG	179
CBF ₁₂₋₁	ATCTTGGCTCCGTTGATTTATTC	TGTGAGACCGGTTTTGGTGC	ND
CBF ₁₂₋₂	GGTACGAGGTGCCGACGCATTGTG	TGGGTCCACACCGTCCACGTACG	ND
CBF ₁₂₋₃	GGCGAAATGGACGCGGGCACGTAC	TGGGTCCACACCGTCCACGTACG	ND
CBF ₁₃	TGGACATCGACATGTTTCAGGCTTG	CAGAGCAGAATCAGATGGGGAATC	212
CBF ₁₄	GGAAGACTTTGAGCTCGGTGGCGTCG	CAAGTACAAATGCGCCCTCCCCAAA	207
CBF ₁₅	CAGTTCCGTCTCAAAGCTGGTGTGGC	TTCAGGTGCGAGGAGGACGACGG	212
CBF ₁₆	GCGGCATGCCTCCAACAGCGCAG	ACGTGCCCAGGTCCATCTCCCCG	199
CBF ₁₇	ACTTCGAGTTCGACGTGTCCTGGGTG	ACTACTGACTCCAGAGCGCGGCGTC	302
CBF ₁₈₋₁	ACAATGGAGACTGCGCCGAC	ACAGAAGTTCGGCCAACTCCCG	ND
CBF ₁₈₋₂	ATGGAGCCACCGCCTAGCATG	CCGGTGCATTGAATCTGAGAC	ND

Primers pour les Cbf 12, Cbf 18 (pas d'amplification) et Cbf4 (amplification majeure d'un seul mRNA de Cbf).

Tableau 4. Séquences des couples d'amorces des gènes spécifiques utilisés sur orge pour l'analyse RT-PCR ainsi que la taille de l'amplifon correspondant, les signes +/- désignent la présence /absence de l'amplification

GENES	ACCESSION	AMORCES	(pb)	Bande
6G2	AY465427	F GGGTGCATACAGGACATGGAGGAT R CCCGTGGTTGCTCGATTTTGTGC	1196	+
HvCBF1 (HvCBF1-Dt)	AF418204 AY785837	F GGATGCTCATTGCCCTCCT R AGCCCCAACACTCCTTCGGA	323	+
HvCBF4 (HvCBF4-Dt)	AF298230 AY785849	F ATGGACGTCGCCGACATC R TTAGCAGTCGAACAAATAGCT	675	-
HvCBF2 (HvCBF2-Dt)	AF442489 AY785841	F CGCAAGAGATCAAGGACGCC R GCCTGGTGGAAGAACACAGC	362	-
HV-CBF6-Mx (HvCBF6-Dt)	AY785859 AY785860	F AGCTGGTCCTGAGCGACATG R GCTCTGTTTCCCCAATTTGCAC	286	+
HvWRKY 38	CAD60651	F CCGTCAAAGCCTGCGCAGACAAAGC R ATGTTACAACCTCCCTCGCCG	150	+
TaWRKY 51	TC237337	F GGACGAGCAGGTGGCCATCAG R CAGCTCGCGGCCGAGACGCT	360	+
P5CS Δ 1-Pyr-5-carbo- synthét	Ta.7091.1.S1_at	F TATAGCTCAATGGCATGCACCCTCG R TCTGCACCTAGACCGAAGCGAAGTCC	212	+
Ta-ORNITINA cyclo deaminase	TaAffx.3441.1.S1_at	F CAGCGACGATGAGATCACCGTG R TGCCACAGCTGATGATCAGAAGCAC	271	+
Hv-DHN8	AF043093 génom AF181458 cDNA	F AGAAGAAGGAGGAGGAGGACAAG R AGAAGCCTTTCTTCTCCTCCTCG	524	+
Hv-GAD Glut- decarboxylase	TC130833	F TGCCGGAGAACTCGATCCCCAAG R TTCTGGAGCTCGGTGGTGAC	201	+
Hv-GABA -T Gam-aminobut-transaminase	TC149893	F ATTCACAGCTGGATGGCAGAGC R AGGAAGATGGAAGCGCCAGTAGTG	520	+
Hv-SSADH Succ- semialdéhyde déshydroge	TC132154	F CTACGACGGGAAGACCATCGAG R ATGCTGGTCCAACCTTTCTGG	446	+
ICE1 Inducer cbfs	TC104574	F CTGAGCAATGCAAGGATGG R GACACAGGGTAGTGACATCAGG	311	+
Hv-ACTINE	TC131417	F ATGTGGCCATCCAGGCAGTGCTTT R TGGTCTCATGGATTCCAGCAGCTTCC	455	+

3.8. ANALYSE DES DONNEES

Les variables mesurées sont soumises à une analyse de la variance avec le logiciel MSTATC (1991). La comparaison des moyennes est faite relativement à la plus petite différence significative au seuil de 0.05 de probabilité (Steel et Torrie, 1982).

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Evolution de la surface foliaire, la biomasse accumulée et la teneur en eau sous l'effet du déficit hydrique

1.1. Variation de la teneur en eau du sol cultivé des traitements hydriques modéré et sévère

La variation de la teneur en eau du sol, déduite par le suivi quotidien, des trois traitements étudiés : 95%, 40% et 20% d'humidité, est indiquée en figure 9. La différenciation entre l'humidité du sol du traitement irriguée (95% humidité) et l'humidité des deux autres traitements (40 et 20%) devient assez marquée dès le 8^{ème} jour après imposition du stress, par arrêt des apports d'eau.

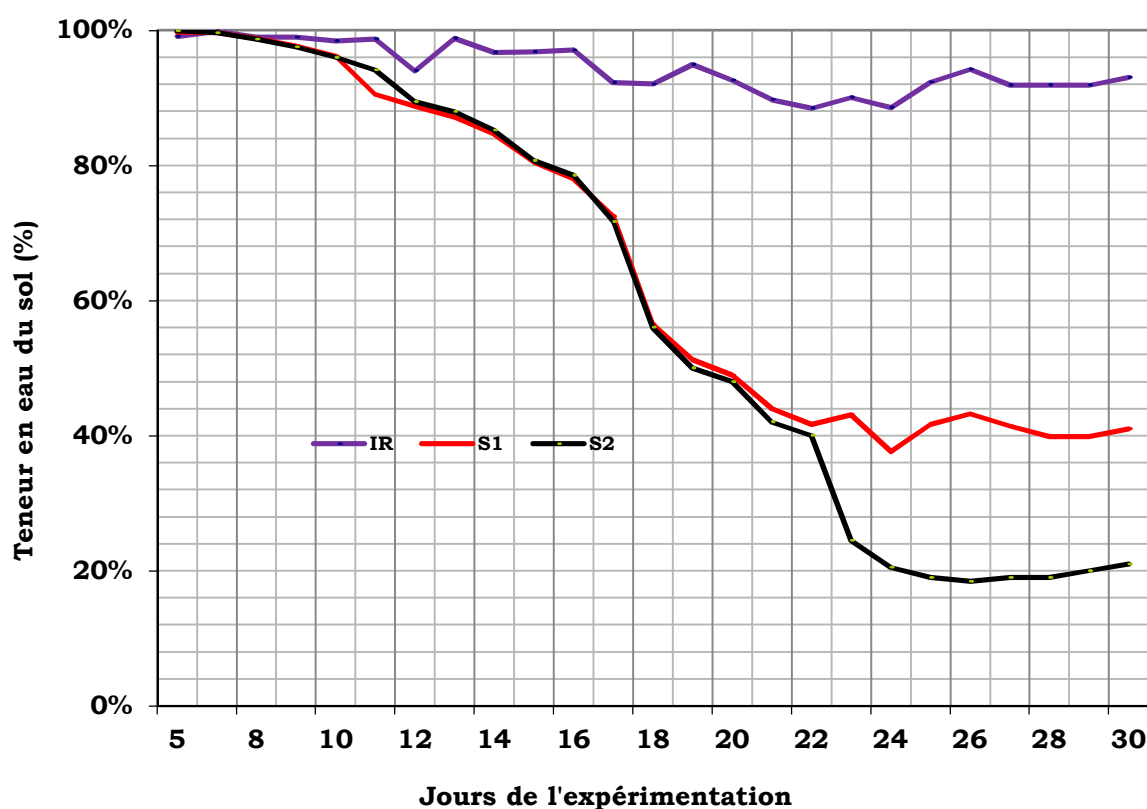


Figure 9. Variation de l'humidité du sol des trois traitements de stress hydrique imposés (95% humidité = IR = irrigué ; 40% humidité = S1= stress modéré ; S2 = 20% d'humidité = stress sévère).

Le niveau du stress hydrique de 40% d'humidité est atteint au terme de 23 jours, et il est maintenu à ce niveau par des apports d'eau d'irrigation. Le niveau de stress hydrique de 20% est atteint immédiatement après le traitement S1, dès le 25^{ème} jour (Figure 9). L'évolution de l'humidité du sol sous les différentes variétés est indiquée en figure 10, pour le stress modéré de 40%, et en figure 11 sous stress sévère de 20%. On note que la variété de blé dur Ofanto est celle qui utilise moins l'humidité du sol, tout au long de l'expérience, comparativement aux variétés d'orge (Figures 10 et 11).

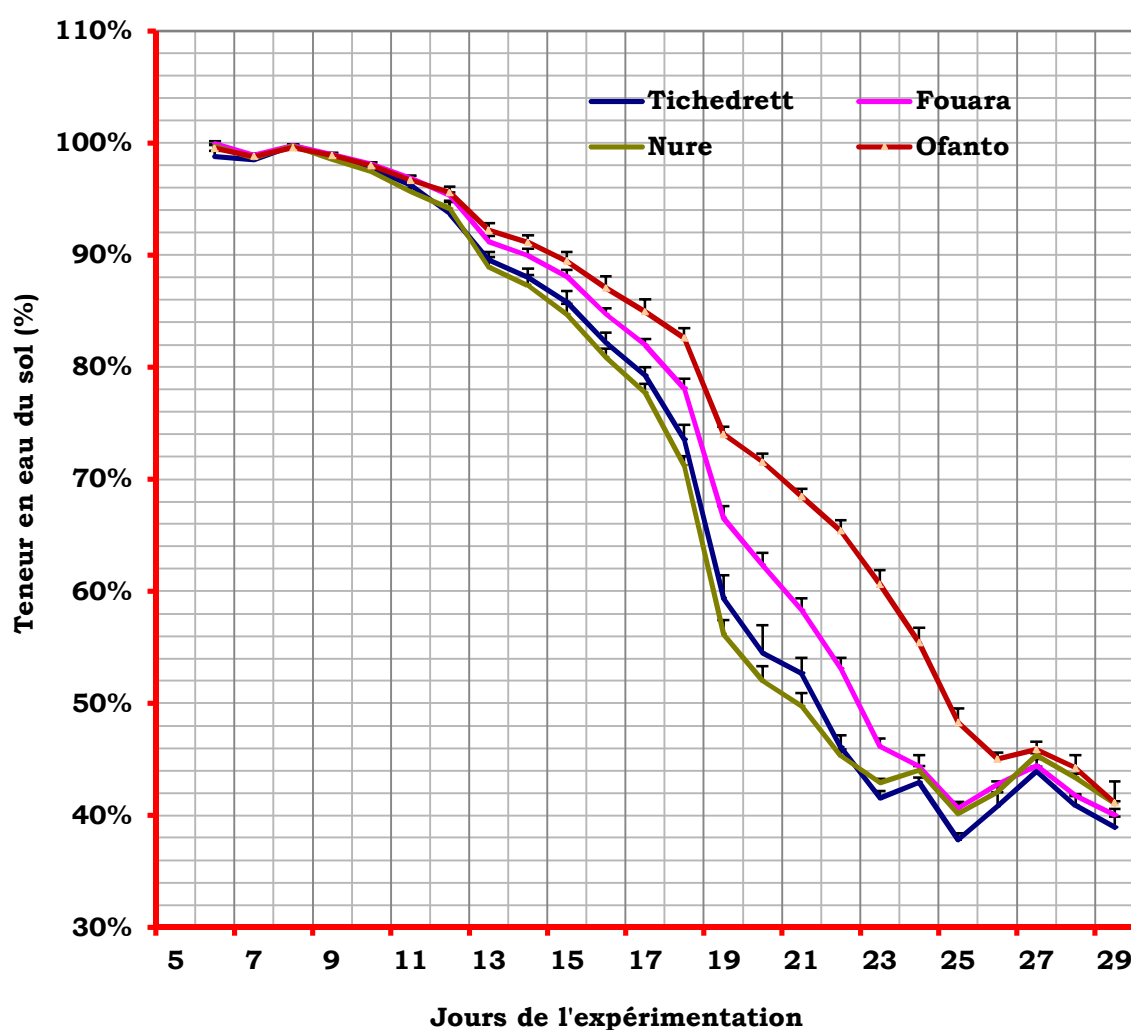


Figure 10. Variation de l'humidité du sol cultivé en orge, variétés Tichedrett, Fouara et Nuré et en blé dur, cultivar Ofanto, sous stress hydrique modéré de 40% (les barres indiquent l'erreur standard).

Chez l'orge, les variétés Tichedrett et Nuré utilisent plus d'humidité du sol comparativement au cultivar Fouara, qui se caractérise par une utilisation intermédiaire (Figures 10 et 11). De ce fait, les variétés Tichedrett et Nuré affrontent le stress hydrique plus tôt que les variétés Fouara et Ofanto. Ces différences de comportement, du point de vu utilisation de l'humidité du sol, relèvent des différences d'espèce : orge vs blé dur, et des différences variétales, à l'intérieur de l'espèce orge : Tichedrett et Nuré vs Fouara.

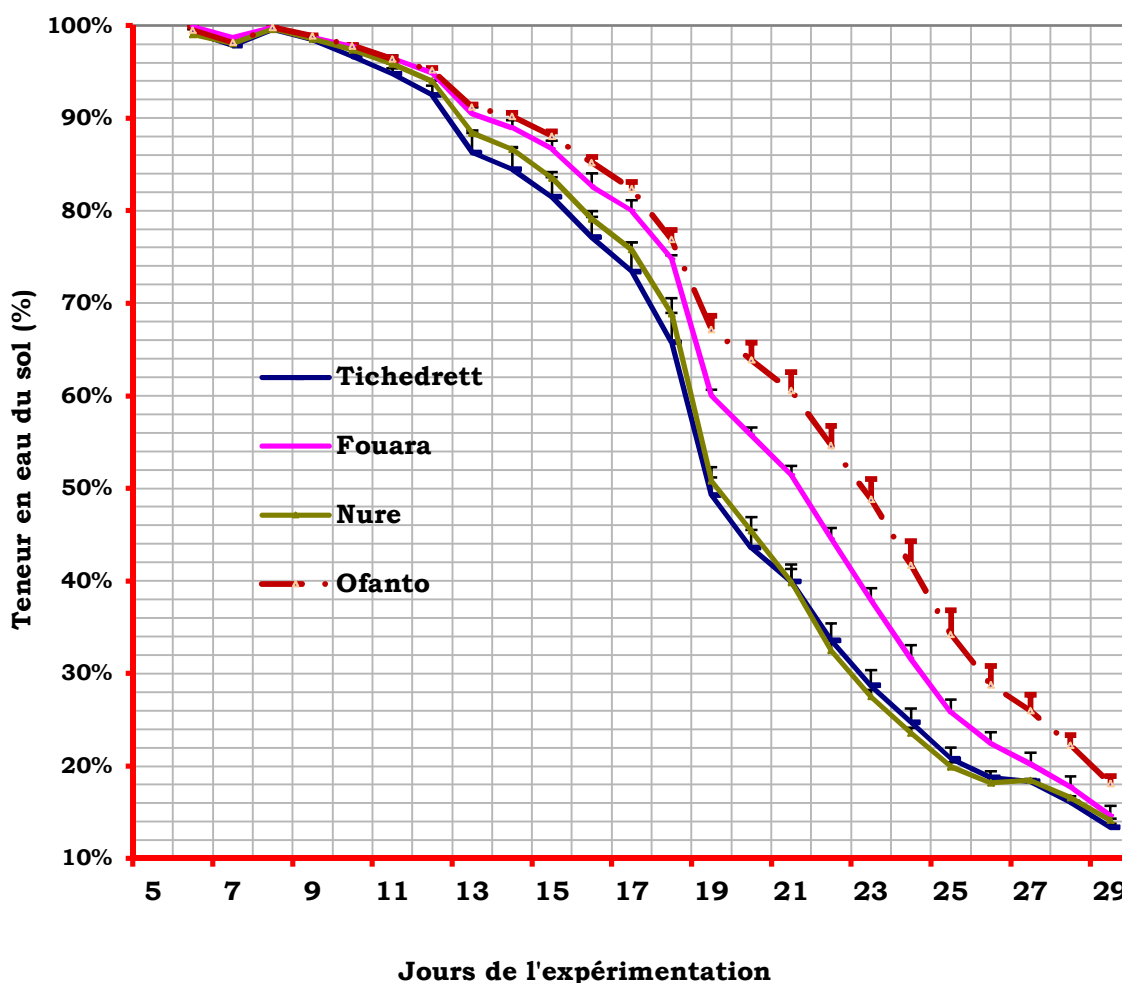


Figure 11. Variation de l'humidité du sol cultivé en orge, variétés Tichedrett, Fouara et Nuré et en blé dur, cultivar Ofanto, sous stress hydrique sévère de 20% (les barres indiquent l'erreur standard)

Les différences d'utilisation de l'humidité du sol l'eau sont liées la vitesse d'installation de la culture, à la vigueur de croissance, et à l'indice foliaire

qui s'établit. Ainsi à l'intérieur d'une même espèce, les variétés de printemps, et celles qui sont alternatives, moins exigeantes en photopériode et en températures vernales, se développent plus rapidement que les variétés de type hiver qui végètent, prenant plus de temps pour se développer et passer d'un stade phénologique à un autre (Ostorom *et al.*, 1993). Le blé dur se développe relative moins vite que les variétés d'orge d'une manière générale. Cette différence est liée à l'espèce.

1. 2. Effet du stress hydrique sur l'évolution de la longueur et la surface foliaires

1.2.1. Effet du stress hydrique sur la longueur cumulée du feuillage du brin-maître

L'évolution de la longueur cumulée du feuillage émis par le maître-brin, du stade 3 feuilles jusqu'au stade 6-7 feuilles des différentes variétés, en absence de stress hydrique, est indiqué en figure 12. Si les différences ont peu perceptibles en début de l'expérience, au stade trois feuilles, où la longueur cumulée varie de 8.0 cm chez Tichedrett à 11.5 chez Fouara et chez Ofanto ; elles deviennent plus importantes au stade 6-7 feuilles.

En effet, le blé dur Ofanto produit une longueur cumulée du feuillage plus faible, d'une valeur de 137.4 cm, comparativement à celle émise par l'orge qui varie de 151.2 cm, chez Nuré, à 168.2 cm, chez Tichedrett, n fin de l'expérience. La longueur du feuillage du maître-brin de Fouara est intermédiaire, avec une moyenne de 162.2 cm (Figure 12).

Le stress hydrique réduit de la longueur cumulée du feuillage du maître-brin, comparativement traitement en situation de confort hydrique. En moyenne des deux traitements du stress hydrique, la réduction est de 6.2, 5.1, 4.2 et 5.5%, respectivement pour Tichedrett, Fouara, Nuré et Ofanto, à la fin de l'expérience. L'effet de l'intensité du stress hydrique est plus marqué chez les orges que chez le blé dur Ofanto (Figure 13). En effet sous stress hydrique modéré, la réduction de la longueur cumulée du feuillage émis par le maître-brin est de 1.54, 2.17, et 1.52% chez les orges Tichedrett, Fouara

et Nuré, et atteint 4.99% chez le blé Ofanto (Figure 13). Ces résultats suggèrent que le blé dur Ofanto est plus sensible à un stress hydrique d'intensité moyenne comparativement aux orges Tichedrett, Fouara et Nuré (Figure 13).

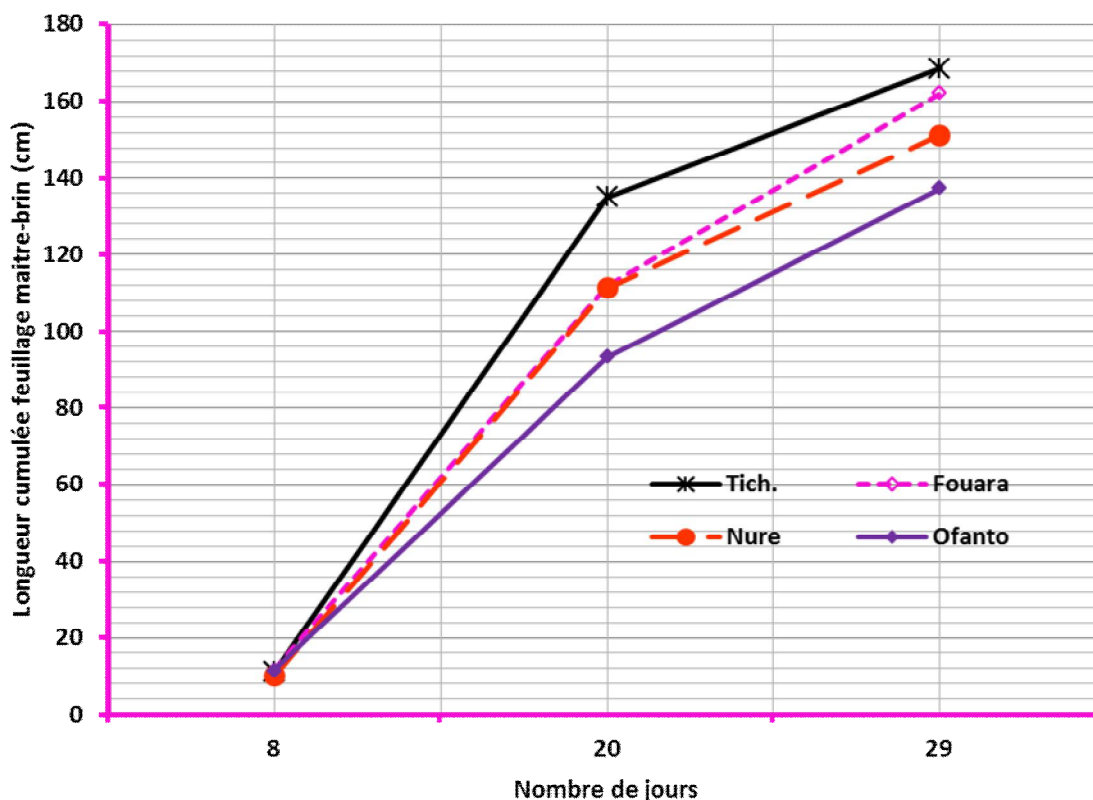


Figure 12. Evolution de la longueur cumulée du feuillage du brin-maître des différents génotypes en absence de stress hydrique (IR).

Sous stress hydrique plus sévère, la réduction de la longueur cumulée du feuillage émis par le maître-brin est de 10.85, 7.95, et 6.81%, respectivement chez les orges Tichedrett, Fouara et Nuré, et uniquement de 5.95% chez le blé Ofanto, à la fin de l'expérience (Figure 13). Ces résultats suggèrent que, sous stress plus sévère, le blé dur Ofanto se montre moins sensible comparativement aux orges Tichedrett, Fouara et Nuré (Figure 13).

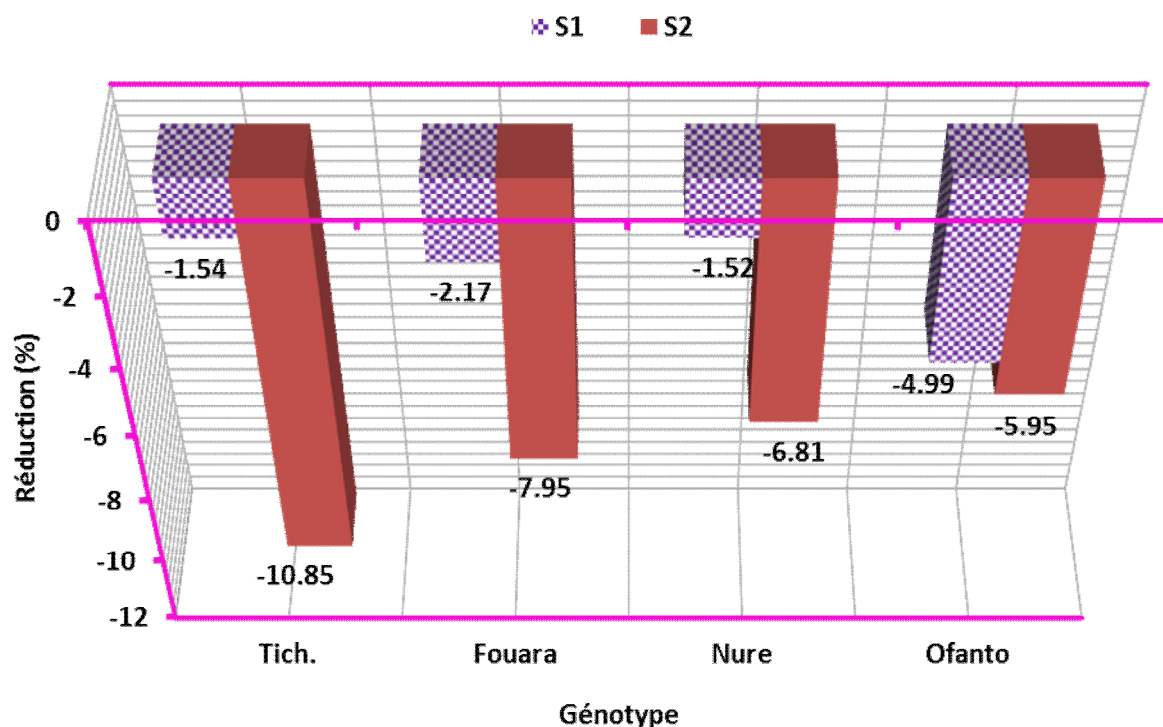


Figure 13. Réduction relative de la longueur cumulée du feuillage du brin-maître des différents génotypes sous stress hydrique modéré (S1) et sévère (S2).

1.2.2. Effet du stress hydrique sur la surface foliaire du brin-maître

L'évolution de la surface du feuillage portée par le brin-maître, en situation de confort hydrique (IR), pour les différentes variétés étudiées, est indiquée en figure 14. Les orges Tichedrett, Fouara et Nuré développent une cinétique de production foliaire différente de celle du blé dur Ofanto (Figure 14). En effet, la surface foliaire du blé dur varie au cours de l'expérience entre 23.3 à 586.1 cm². Alors que la moyenne des trois génotypes d'orge varie de 39.4 à 801.7 cm². L'orge développe donc une surface foliaire 37.80% plus large que celle du blé dur Ofanto (Figure 14). Avec des moyennes de 830.2 et 802.2 cm², Tichedrett et Fouara développent des surfaces foliaires assez proches. Au contraire, Nuré développe une surface foliaire plus réduite qui atteint la valeur de 772.8 cm², au terme de l'expérience (Figure 14).

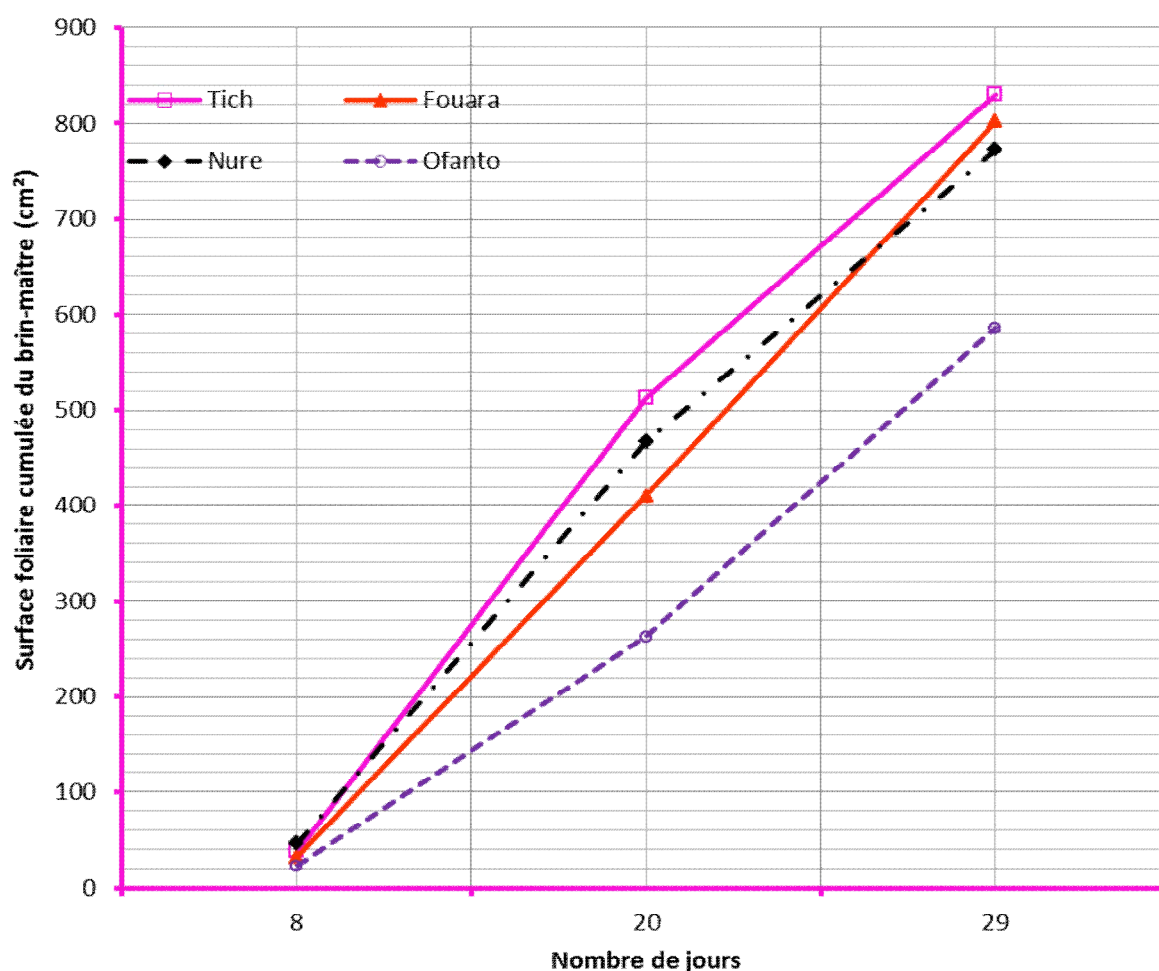


Figure 14. Evolution de la surface foliaire du brin-maître des différents géotypes en absent de la contrainte hydrique (IR).

La réduction de la surface foliaires des différentes variétés sous stress hydrique, modéré et sévère, est indiquée en figure 15. Sous stress hydrique modéré, Tichedrett se montre tolérante, et ne présente pas une réduction significative par rapport à la surface développée en situation de confort hydrique (Figures 14 et 15). Par contre, les variétés Fouara, Nuré et Ofanto réduisent leur surface foliaire respective de 12.91, 7.09 et 18.11%, respectivement (Figure 15).

Ces résultats indiquent qu'après Tichedrett, Nuré est la moins sensible à ce niveau de stress hydrique comparativement à Fouara et Ofanto. Sous stress hydrique sévère, Tichedrett, Fouara et Ofanto se montrent les plus sensibles et réduisent leur surface foliaire respective de 21.80, 20.38 et

20.65% alors que Nuré affiche une réduction de 16.86% (Figure 15). Sous stress hydrique sévère le cultivar Tichedrett change de comportement en se montrant moins tolérant, à l'inverse du cultivar Nuré qui montre une plus grande tolérance à ce niveau de stress hydrique (Figure 15).

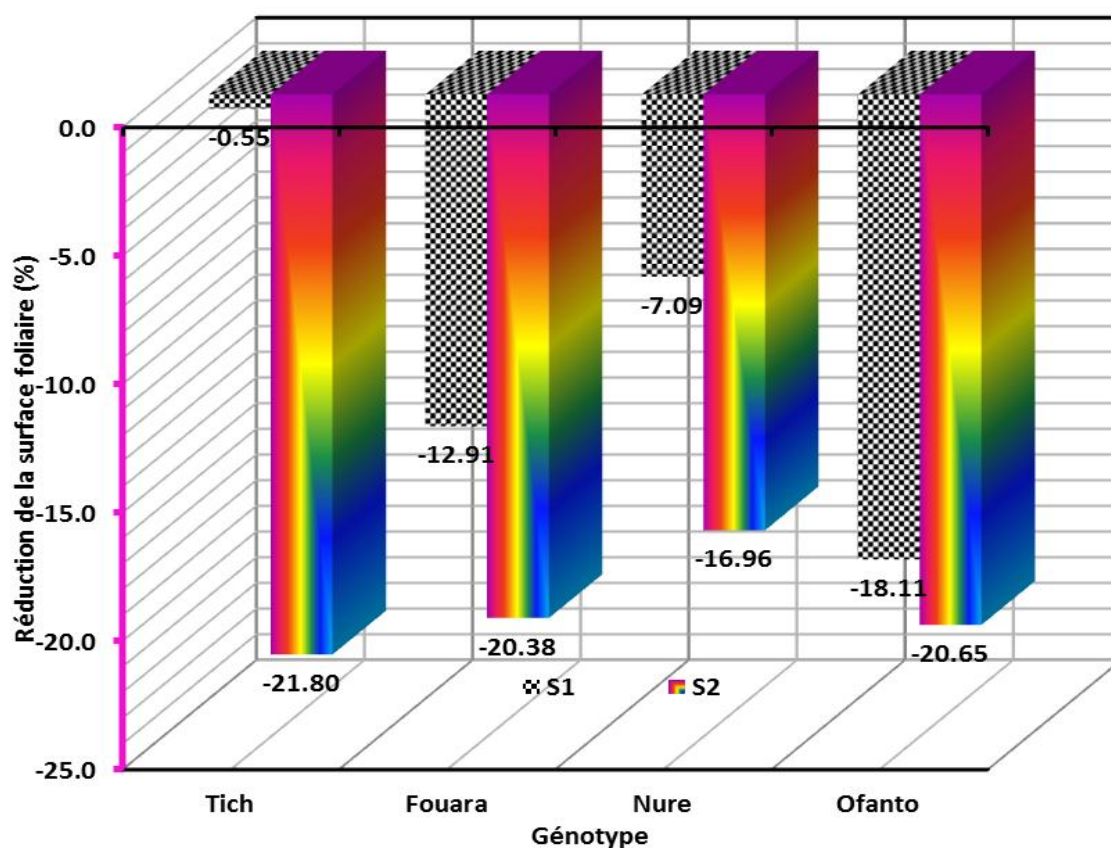


Figure 15. Réduction relative de la surface foliaire du brin-mâitre des différents génotypes sous stress hydrique modéré (S1) et sévère (S2), comparativement à l'irrigué (IR), à la fin de l'expérience.

1.2.3. Effet du stress hydrique sur l'accumulation de la biomasse aérienne du brin-mâitre

La biomasse accumulée, en fin de l'expérience, était de 825 mg de matière sèche pour Fouara, 945 mg pour Tichedrett et 947 mg pour Nuré. Celle de Ofanto n'a pas été mesurée. Ces valeurs moyennes sont calculées en moyenne des trois traitements hydriques. Elles indiquent que génétiquement

Fouara est moins apte à produire plus de biomasse comparativement à Tichedrett et Nuré (Figure 16).

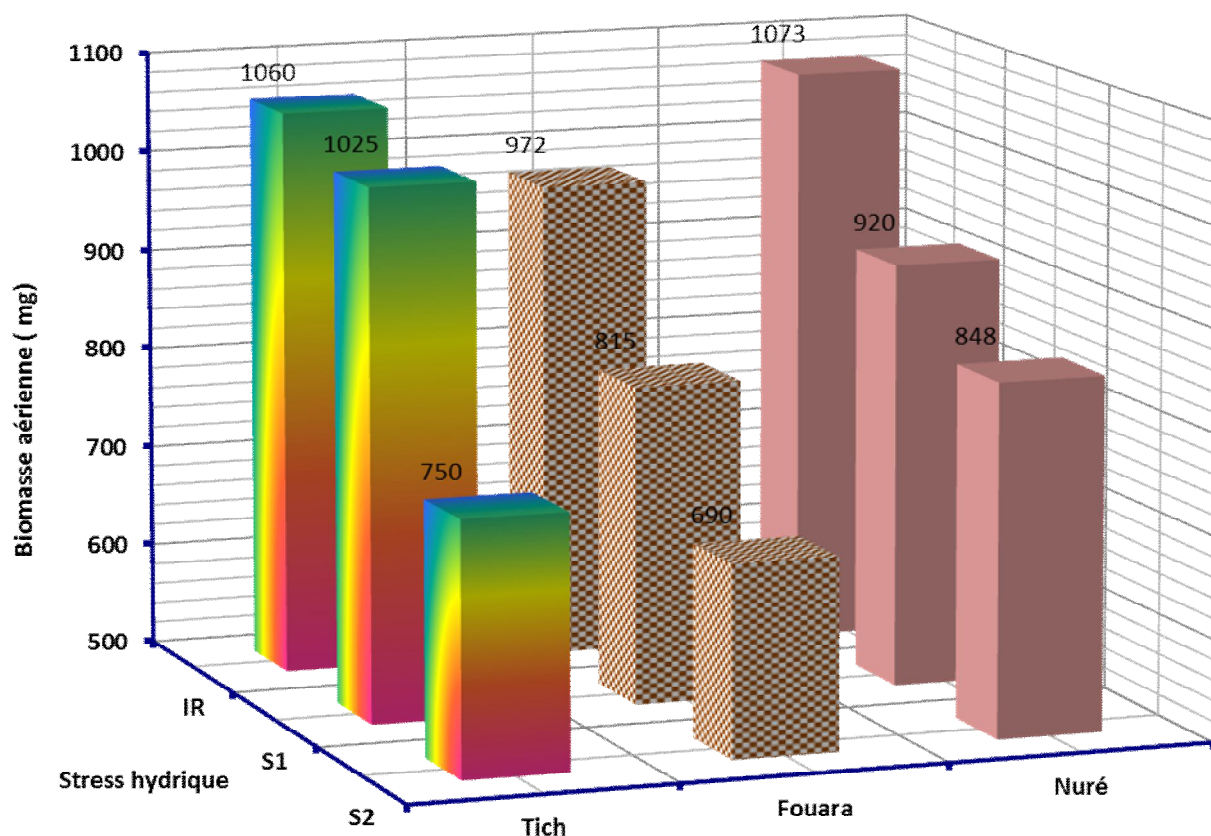


Figure 16. Evolution de la biomasse aérienne par pot des différents génotypes en absence de stress (IR), sous stress hydrique modéré (S1) et sévère (S2), à la fin de l'expérience.

En moyenne des trois génotypes d'orge, la moyenne de la biomasse aérienne accumulée par niveau de stress était 1035 mg pour le traitement irrigué, 920 mg pour le stress hydrique modéré et 762 mg pour le stress hydrique sévère (Figure 16). L'étude de l'interaction génotype x stress hydriques montre que Tichedrett se montre tolérant au stress modéré à l'inverse des variétés Fouara et Nuré qui réagissent de manière significative (Figure 16). Sous stress sévère, c'est Nuré qui se montre moins sensible que Tichedrett et Fouara qui sont fortement affectées (Figures 16). La réduction,

en pourcent de la biomasse aérienne accumulée en absence de stress hydrique, est indiquée en Figure 17.

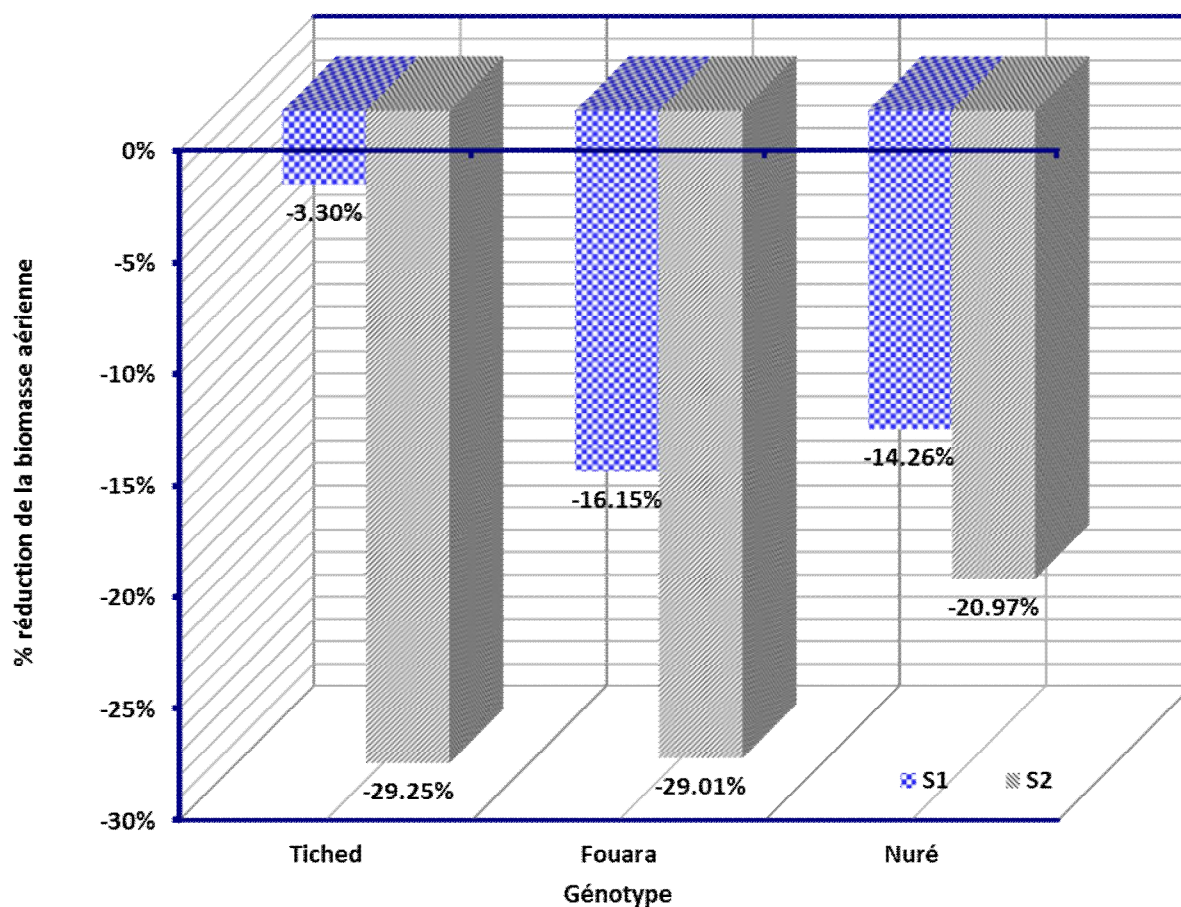


Figure 17. Réduction relative de la biomasse aérienne par pot des différents génotypes sous stress hydrique modéré (S1) et sévère (S2), comparativement à l'irrigué (IR), à la fin de l'expérience.

Elle indique que sous stress modéré c'est Tichedrett qui est la plus tolérante alors que sous stress hydrique sévère, c'est Nuré qui est la plus tolérante (Figure 17). La réduction relative chez Tichedrett passe de 3.3 à 29.25%, en passant du stress modéré au stress sévère. Sous les mêmes conditions, la réduction chez Fouara varie de 16.15 à 29.01% et chez Nuré de 14.26 à 20.97% (Figure 17). Ces résultats suggèrent que la tolérance est dépendante de l'intensité du stress et du fond génétique étudié.

Les résultats de la présente étude indiquent que les variétés d'orge présentent une longueur du feuillage cumulée, mesurée sur le brin-maître,

plus importante que celle du blé dur Ofanto. Parmi les variétés d'orge, Tichedrett développe une longueur du feuillage plus importante, suivie de Fouara et de Nuré. La réduction de la longueur du feuillage, sous stress hydrique modéré, quoique modeste, est plus importante chez le blé dur que chez l'orge. On note cependant le comportement inverse sous stress sévère où la variété d'orge Tichedrett enregistre une réduction presque deux fois plus importante que celle observée chez le blé dur Ofanto.

La réduction de la longueur foliaire chez Nuré et Fouara est proche de celle enregistrée chez le blé dur. Ces résultats indiquent que Fouara et Nuré réagissent progressivement à l'intensité du stress hydrique, se montrant plus tolérantes sous stress modère que sous stress sévère. Par contre Tichedrett et Ofanto présentent des comportements opposés. Tichedrett se montre tolérant au stress modéré et très sensible au stress sévère, alors qu'Ofanto adopte le comportement inverse. La surface foliaire développée est hautement corrélée avec la longueur foliaire ($r = 0.9405^{**}$, $n = 12$).

Les résultats indiquent, qu'en absence de stress hydrique, l'orge montre une capacité à développer une surface foliaire 37.80% plus importante que celle du blé dur Ofanto. Tichedrett présente la surface foliaire la plus importante en valeur suivie de Fouara. Nuré développe une surface foliaire légèrement plus réduite comparativement à celle de Tichedrett. Ces différences ont pour origine des différences d'ordre génétiques. Sous stress hydrique modéré et sévère, les différentes variétés présentent un comportement similaire à celui de la longueur foliaire.

L'analyse des données de la biomasse aérienne accumulée indique que génétiquement Fouara produit moins de biomasse que Tichedrett et Nuré. Sous stress modéré, la réduction de la biomasse est moindre chez Tichedrett alors que sous stress sévère, elle est la plus importante chez ce cultivar et moindre chez Nuré. Les résultats montrent que l'effet du déficit hydrique sur la longueur, la surface foliaire et la biomasse aérienne varie selon l'intensité du stress et du fond génétique étudié. Ceci corrobore ce qui a été rapportés par Alves et Setter (2004) qui mentionnent que le stress hydrique provoque

une multitude d'effets sur le fonctionnement de la plante dont la réduction de l'élongation et de la division cellulaires sont les premiers symptômes, conduisant à la diminution la surface foliaire photosynthétique.

Chaves *et al.*, (2009) font observer que sous stress hydrique modéré, la plante répond par la fermeture des stomates, pour maintenir plus d'eau dans ces tissus. Par contre sous stress hydrique modéré, la plante fait intervenir peu les mécanismes de l'ajustement osmotique, ou l'accumulation des déshydrines (Alves et Setter, 2004). Ce comportement est observée chez plusieurs espèces comme le blé (*Triticum aestivum* L.), l'orge (*Hordeum vulgare* L.), le maïs (*Zea mays*) et le cassava (*Vigna unguiculata*) (Tardieu et Simmoneau, 1998 ; Alves et Setter, 2004), qui évitent d'investir dans la production coûteuse d'osmolytes, tout en s'acclimatant au stress de nature intermittente (Alves et Setter, 2004).

Prasad *et al.*, (2008) font remarquer que la croissance foliaire est inhibée dès que la plante est soumise au déficit hydrique. La diminution de l'élongation foliaire fait suite à une réduction de l'ouverture, voire la fermeture, des stomates (Prasad *et al.*, 2008). Elle se traduit par une baisse de la quantité d'énergie lumineuse absorbée amenant une réduction de la quantité de biomasse aérienne accumulée. C'est l'effet stomatique du déficit hydrique sur la photosynthèse. L'effet non stomatique est observé pour des stress hydriques sévères qui endommagent l'appareil photosynthétique. La fermeture des stomates semble être la première ligne de défense de la plante contre le manque d'eau. Ce mécanisme est plus rapide à mettre en œuvre par la plante que la mise en marche de la machinerie nécessaire pour changer la répartition des assimilats ou produire des osmolytes (Chaves *et al.*, 2009).

Dans le cas où l'hypothèse de la fermeture des stomates est valable pour expliquer le comportement des génotypes étudiés, il semble que, sous stress modéré, Tichedrett présente une fermeture stomatique moins sensible au déficit hydrique que les autres variétés. Poormohamad- Kiani *et al.*, (2007) mentionnent l'existence des différences génotypiques pour la conductance

stomatique et l'assimilation nette. Casadebaig *et al.*, (2008) ont mis en évidence des différences de seuils de fermeture stomatique chez différentes variétés, en fonction de la fraction de l'humidité du sol disponible. Ainsi dans la présente étude, Tichedrett et Nuré utilisent plus d'humidité du sol comparativement à Ofanto (Figure 11).

Il y a donc une différence d'ordre génétique de performance des variétés, en termes de contrôle du taux de transpiration. Ofanto fait intervenir la fermeture stomatique plus précocement que Tichedrett. La régulation de la fermeture des stomates apparaît donc comme un mécanisme majeur, mise en œuvre, pour limiter les pertes d'eau. Tichedrett, sous stress modéré, en ne fermant que partiellement ses stomates comparativement à Ofanto, améliore l'efficacité d'utilisation de l'humidité du sol. Ceci suite à la différence qui existe entre les coefficients de diffusion de l'eau et du CO₂ dans la feuille. Dans ce cas, la transpiration est proportionnellement plus réduite que l'assimilation nette. Sous stress sévère, Tichedrett fait intervenir la fermeture stomatique à un seuil plus élevé, comparativement à Ofanto qui semble s'adapter à ce stress. En cherchant à réduire la transpiration via le degré de fermeture des stomates, les variétés étudiées adoptent la stratégie de l'évitement de la contrainte hydrique.

Le fait, qu'Ofanto semble s'adapter au stress sévère, permet d'admettre l'hypothèse que cette variété fait intervenir l'ajustement osmotique. Les solutés impliqués peuvent être des ions inorganiques, des sucres solubles, ou des acides aminés comme la proline et la glycine-bétaïne et organiques (Munns *et al.*, 2006 ; Benderradji *et al.*, 2012). Le coût énergétique d'un tel ajustement est plus élevé que celui mis en œuvre lors de la fermeture des stomates, mais il permet à la variété de tolérer le stress qu'elle subit.

2. EFFET DU STRESS HYDRIQUE SUR L'EXPRESSION DES GENES CBF CHEZ LE BLE DUR

Les 11 gènes Cbf, étudiés chez le blé dur soumis à la contrainte hydrique figurent parmi les 13 gènes étudiés chez *Triticum monococcum* L. par Miller *et al.*, (2006). Les résultats indiquent que les couples d'amorces

des gènes *TmCBF12* et *TmCBF18* n'ont pas donné de produits d'amplification. Les gènes *Cbf3*, *Cbf9*, *Cbf13*, *Cbf14* et *Cbf15* montrent, par contre, une surexpression dépendante du degré du stress hydrique (Figure 18). Les gènes *Cbf2* et *Cbf16* se sont surexprimés uniquement sous déshydratation rapide. Les trois autres gènes montrent une similitude de comportement sous les deux types de stress, *Cbf5* et *Cbf15* se sont surexprimés alors que *Cbf10* s'est sous exprimé (Figure 18).

Le niveau de transcription dans les racines d'Ofanto, échantillonné au stade troisième feuille, diffère d'un gène à un autre (Figure 18). Le niveau des transcrits des gènes *Cbf2*, *Cbf16* et *Cbf17* est fortement surexprimé sous les deux types de stress, contrairement aux mRNAs des gènes *Cbf5*, *Cbf9*, *Cbf10* et *Cbf15* qui sont peu influencés par le type de stress appliqué. Les gènes *Cbf3*, *Cbf13* et *Cbf14* se sont sous exprimés. Au stade d'épiaison, les gènes *Cbf*, des tissus de la feuille drapeau d'Ofanto, montre une variation dans le degré de surexpression (Figure 18). Dans le tissu de la glume d'Ofanto, au stade du grain laiteux, le niveau d'expression des *Cbfs* est influencé par le stress.

Au stade pâteux, *Cbf2*, *Cbf3* et *Cbf13* se sont surexprimés sous stress, alors que *Cbf15* s'est sous exprimé. Par contre *Cbf5*, *Cbf9*, *Cbf10*, *Cbf14*, *Cbf16*, *Cbf17* réagissent peu au stress imposé (Figure 16). Des différences ont été observées chez Ofanto, Creso et Trinakria, dans l'accumulation des transcrits des *Cbf* de la feuille drapeau, échantillonnée au stade de floraison (Figure 19). Ces résultats indiquent que les gènes *Cbf* étudiés sur s'expriment mieux chez Ofanto, sous la contrainte hydrique, que chez Creso et Trinakria.

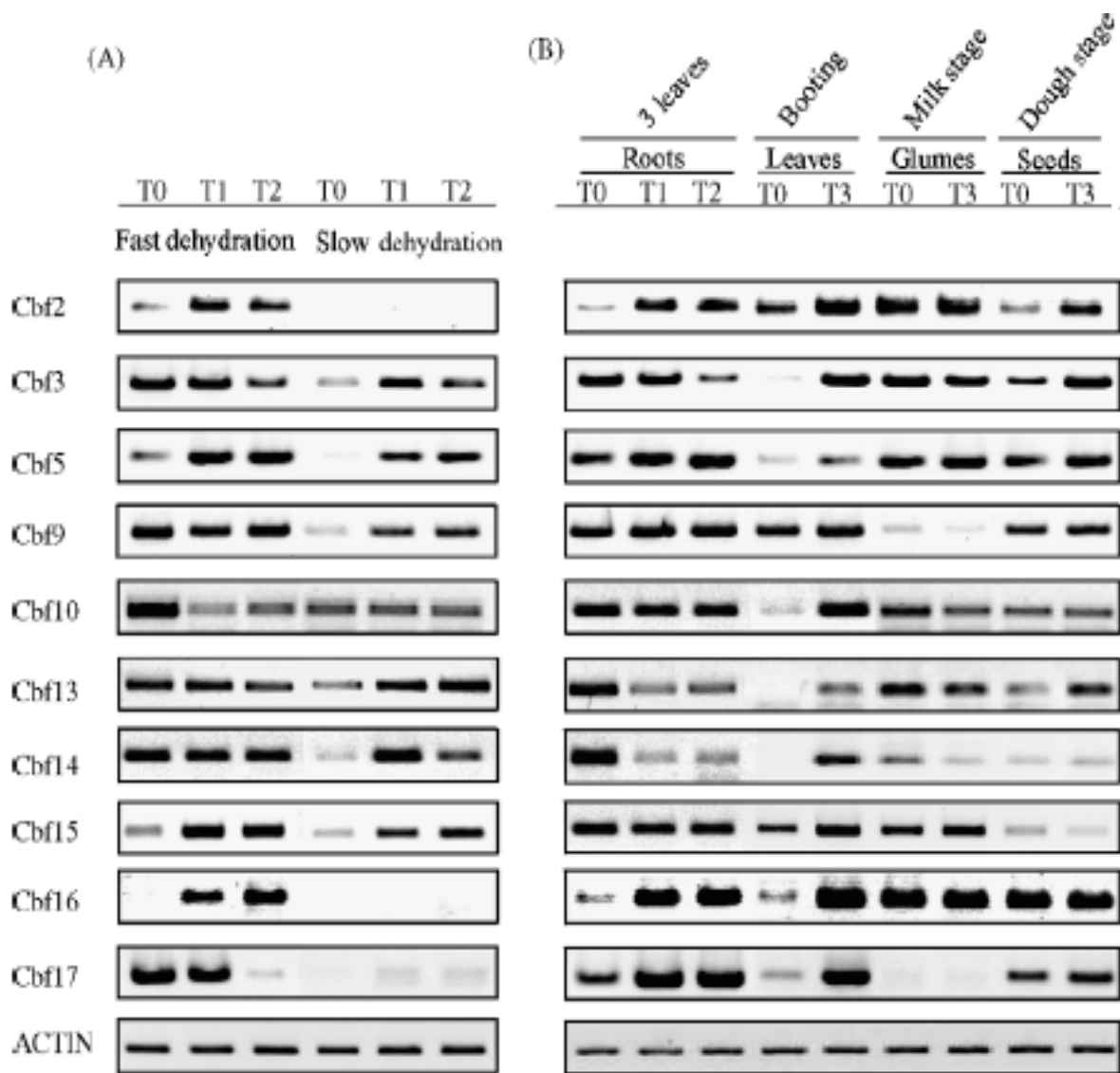


Figure 18. Expression des gènes *Cbf* chez le cultivar Ofanto (A= 3^{ème} feuille soumise à un choc hydrique ou à une déshydratation lente ; B= les racines au stade 3f, la feuille au stade gonflement, les glumes au stade grain laiteux et de la graine au stade grain pâteux).

Seuls *Cbf2*, *Cbf3*, *Cbf5* et *Cbf10* ont été sur régulés par le stress imposé, chez les trois génotypes. Par contre *Cbf15* et *Cbf17* se sont surexprimés chez Ofanto et Trinakria, et se sont sous exprimés chez Creso. *Cbf9* et *Cbf14* montrent une sur régulation chez Ofanto et une sous régulation chez Creso et Trinakria. Aucune variation de l'expression de *Cbf13* et *Cbf16* n'a été notée chez Trinakria, alors qu'ils se sont surexprimés, tous les deux, chez Ofanto, et seul *Cbf13* s'est surexprimé chez Creso.

Ofanto montre le plus grand nombre de gènes sur régulés comparativement à Creso et Trinakria (Figure 19).

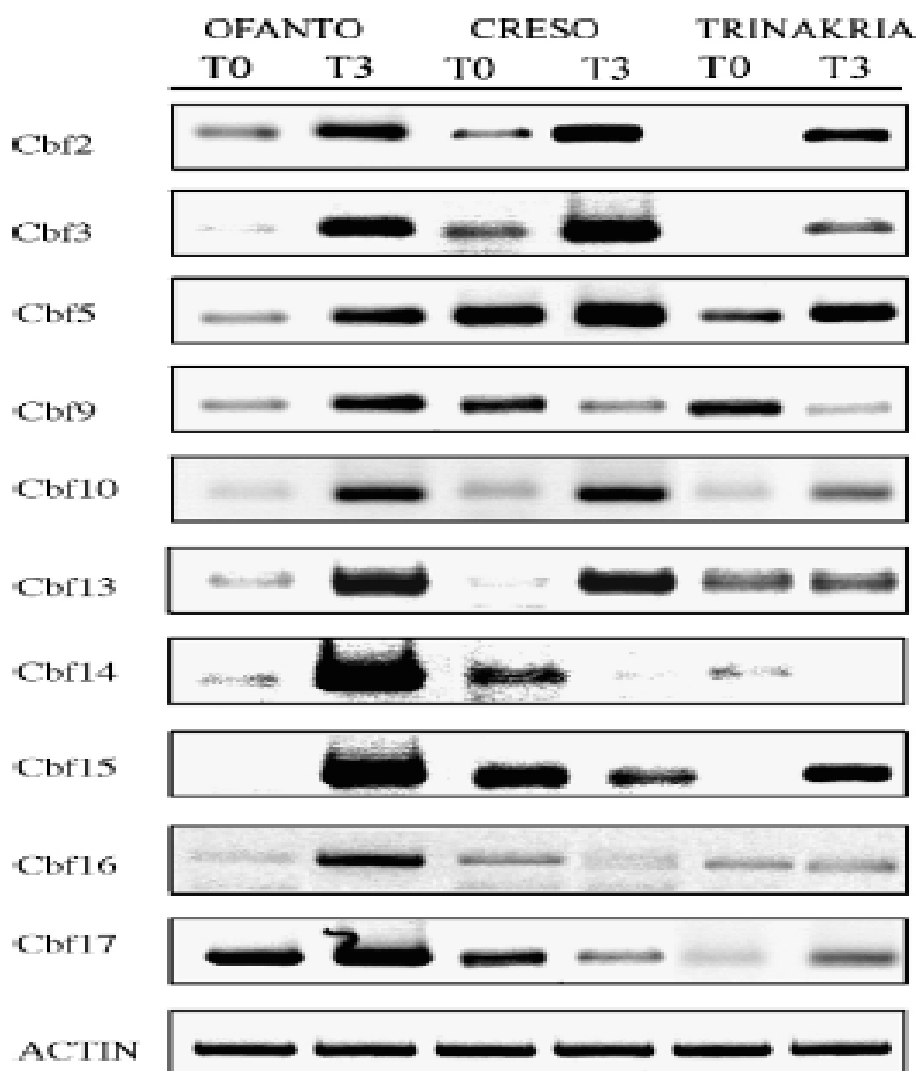


Figure 19. Expression des *Cbf* de la feuille étendard des variétés de blé dur Ofanto, Creso et de Trinakria en absence (T0) et en présence du déficit hydrique (T3).

Les résultats de la présente étude indiquent que les gènes *Cbf*, régulés par le froid, s'expriment, à divers degrés, sous la contrainte hydrique. Ils montrent aussi que les gènes analysés s'expriment différemment chez les variétés de blé dur étudiées. Ces résultats corroborent, en partie, les

résultats de Kume *et al.*, (2005) qui rapportent que le gène *WCbf2* s'est surexprimé chez le blé tendre, sous stress hydrique. Ils rejoignent les résultats de Miller *et al.*, (2006) qui mentionnent la présence d'éléments -cis DRE, potentiellement impliqués dans la réponse au déficit hydrique, dans les séquences promotrices de 8 *Cbf* de *T. monococcum*.

Selon Miller *et al.*, (2006), la plus part des gènes CBF (*TmCbf3*, 10 et 13, *TmCbf2*, 4, 9 et 14) sont localisés sur le chromosome 5 de *T. monococcum*. La famille des CBF a été caractérisée chez *Arabidopsis* par Gilmour *et al.*, (1998) et par Liu *et al.*, (1998). Elle code pour les facteurs de transcription LT-induced (*LTI*) qui lient l'élément-cis *CRT* et induit l'expression des gènes *cor* (Jaglo *et al.*, 2001). Cette famille de gènes est aussi induite sous déficit hydrique et sous salinité (Haake *et al.*, 2002; Dubouzet *et al.*, 2003). Les CBF appartiennent à la superfamille des *AP2/EREBP* (Ethylene Responsive Element Binding Proteins). Ils se distinguent des autres membres par la présence de la signature des séquences motives *PKK/RPAGRxKFxETRHP* et *DSAWR*, directement flanquées au domaine *AP2* (Jaglo *et al.*, 2001).

3. EFFET DU STRESS HYDRIQUE SUR L'EXPRESSION DES CBF CHEZ L'ORGE

3.1. REGULATEURS DE TRANSCRIPTION ET POST-TRADUCTION

L'analyse a été réalisée sur des échantillons au stade 7^{ième} feuille. Le gène *HvCBF1* est induit chez les trois variétés d'orge, sous conditions de stress modéré et stress sévère. Ce gène est plus exprimé chez Fouara que chez Tichedrett et Nure. Des traces d'accumulation du mRNA du *HvCBF1* sont visibles aussi chez les plantes témoins, conduites en l'absence de stress hydrique. Dans les échantillons du stade 1^{ière} feuille, *HvCBF1* ne s'est pas exprimé chez les trois variétés (Figure 20).

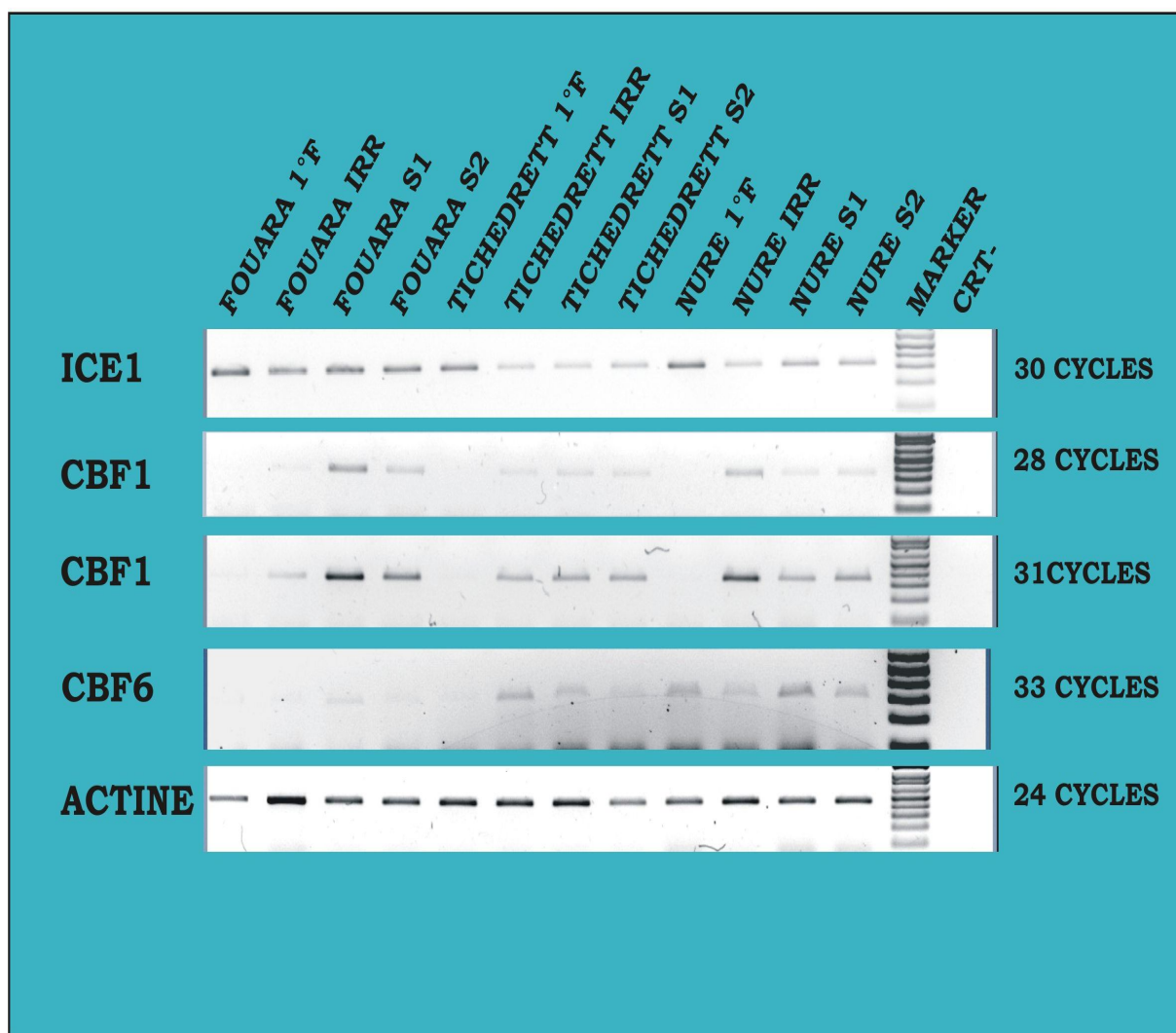


Figure 20. Expression des *HvCBF* des tissus foliaires de l'orge (1°F= une semaine après le semis; IRR= 95% CCP; S1 = 4% CCP, S2 = 20% CCP).

Le gène *HvCbf6* est faiblement exprimé aussi bien en l'absence qu'en présence du stress hydrique; chez Nure et Tichedrett, par contre chez Fouara, l'expression de ce gène est peu perceptible. Skinner *et al.* (2005) mentionnent que le gène *HvCBF1* est induit par le froid et la sécheresse, mais ce gène n'est pas induit par le stress salin. Dans la présente étude *HvCBF1* est activé dans les feuilles soumises à 1 ou 6 heures de déshydratation. Le gène *CBF1* s'exprime chez le témoin, au stade 7^{ième} feuille, alors qu'il ne s'exprime pas au stade 1^{ière} feuille. Ces résultats indiquent que l'expression génique varie en fonction du génotype et du stade

de développent de l'organe échantillonné. Le gène *HvCBF2* n'a pas donné d'amplifications sur l'ensemble des échantillons stressés et témoins. De Leonardis *et al.* (2007) rapportent que *HvCBF2* n'est pas induit par la déshydratation lente.

Le gène *ICE1* s'exprime chez les trois cultivars au niveau des tissus des témoins échantillonnés au stade 1^{ière} feuille (Figure 20). Dans les échantillons pris au stade 7^{ième} feuille, des génotypes soumis et non soumis au stress, le niveau de transcription de *ICE1* est légèrement sous régulé comparativement à l'expression observée au stade 1^{ière} feuille. Ces résultats indiquent que *ICE1* est faiblement induit par le déficit hydrique et que son expression varie en fonction des stades végétatifs.

Selon Dong *et al.*, (2006) *ICE1* est un facteur de transcription constitutivement exprimé qui contrôle l'induction à basse température de *CBF3*. La surexpression de *ICE1* chez l'*Arabidopsis* augmente l'expression des gènes *CBF* en réponse au froid, engendrant la tolérance aux basses températures. *ICE1* s'associe, en absence du stress, à la protéine *HOS1* (high expression of Osmotically responsive gene1), identifiée comme une RING- E3 ligase qui intervient dans le processus d'ubiquitinylation et de dégradation de *ICE1*, via le complexe ubiquitine/protéasome.

La surexpression de *HOS1* chez l'*Arabidopsis* transgénique réduit les niveaux des transcrits des *CBF1*, *CBF2* et *CBF3*, engendrant une baisse de la tolérance au froid. Le gène *ICE1* s'exprime en absence de stress, la protéine correspondante est probablement modifiée par une réaction de phosphorylation en réponse au froid sous une forme active qui lui permettrait de devenir le régulateur positif des gènes *CBF*.

L'expression des gènes *WRKY* diffère d'une variété à l'autre. *Ta-WRKY51* s'exprime progressivement chez Fouara, faiblement exprimé en absence de stress, il accentue son expression sous stress sévère. Chez Tichedrett, *Ta-WRKY51* ne s'exprime que sous stress modéré, et chez Nure il est faiblement exprimé sous stress sévère (Figure 21).

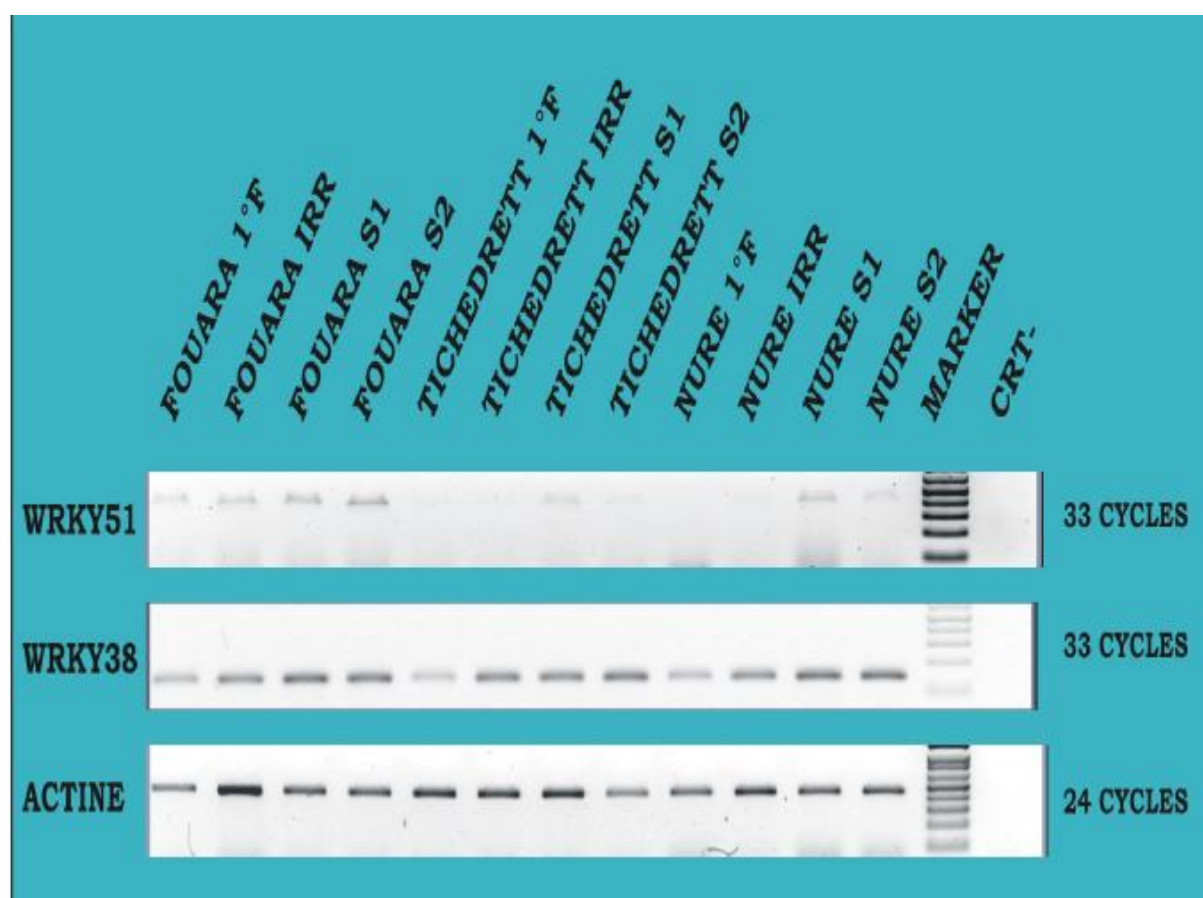


Figure 21. Expression des *WRKY* dans le tissu foliaire de l'orge (1^{ière} F, récoltée une semaine après le semis; IRR = 95% CCP; S1= 40%CCP et S2 = 20%CCP).

Les *WRKY* sont connus pour leur implication dans la régulation de divers processus physiologiques des plantes ainsi que dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Marè *et al.*, 2004). De nombreux facteurs de transcription *WRKY* sont hautement régulés par la sécheresse, le froid et le stress salin (Fowler et Thomashow, 2002). Le gène *Hv-WRKY38* est faiblement exprimé chez les trois cultivars en absence de stress au stade 1^{ière} feuille. Au stade de la 7^{ième} feuille, les transcrit *Hv-WRKY38* se sont exprimés aussi bien en absence de stress que sous contrainte hydrique modérée et sévère. La nature de cette expression indique que le gène *Hv-WRKY38*, au stade 7^{ième} feuille, n'est pas induit par la contrainte hydrique chez aucune

des variétés testées. Marè *et al.* (2004) notent que le gène *Hv-WRKY38* est induit par le froid et par la sécheresse.

Le traitement a été suivi sur les plantules de la variété d'orge Nure croissant sur papier et laissées à température ambiante et récoltées après 30', 90' et 180 minutes de déshydratation. La constatation qui a été faite est que le gène *Hv-WRKY38* s'active fortement et rajoute son plus haut pic d'expression du mRNA déjà, après une demi-heure de traitement, cela signifie que le même type de stress imposé en conditions différentes pourrait induire une réponse moléculaire différente. Le gène 6G2 est un gène *e-cor* (early cold-regulated) de blé dur, induit par les stress abiotiques, à savoir le froid et la sécheresse (Mastrangelo *et al.*, 2005).

Ce gène est caractérisé par une rétention d'un set d'introns au moment de la formation du mRNA mature, une caractéristique qui apparaît lors du stress de froid et de déficit hydrique. Il appartient à la famille génique des enzymes ligases *E3* de l'ubiquitine qui reconnaît, spécifiquement, les protéines cibles ubiquitinyllées pour être dégradées par le complexe du protéasome 26S (régulation post-traductionnelle). Cela suppose que ce gène pourrait être un composant du système d'ubiquitinylation, et donc, il procéderait dans le contrôle post-traductionnel, via la dégradation des protéines (Mastrangelo *et al.*, 2005).

Le gène 6G2 ne s'est pas exprimé dans les échantillons de la première feuille (1° F) des trois variétés d'orge; il est, visiblement, induit par le stress à 20%, chez Tichedrett et Nuré, et plus faiblement chez Fouara. Dans les plantes qui avaient atteint le stade de la 7° feuille, le transcrit de 6G2 s'accumule déjà dans les échantillons irrigués de Tichedrett de Nuré (Figure 22).

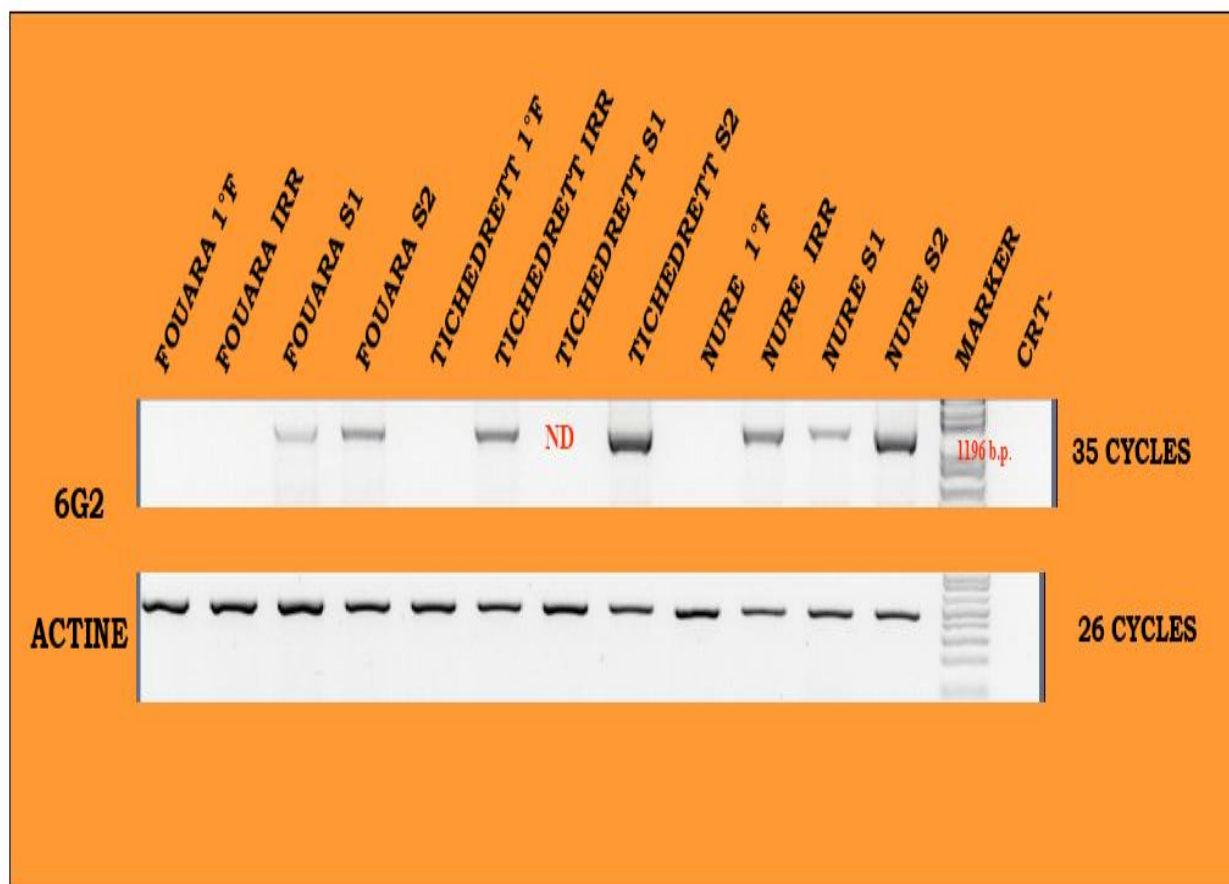


Figure 22. Expression du gène 6G2 dans le tissu foliaire de trois cultivars d'orge (1°F: 1^{ière} feuille une semaine après le semis; IRR = 95% CCP, S1 = 40% CCP, S2= 20% CCP. ND: Non Déterminé).

4. ENZYMES DES MOLECULES OSMOPROTECTRICES

4. 1. LE GABA-SHUNT

Parmi de nombreux composants qui semblent servir en tant qu'osmoprotectants chez les plantes, l'acide aminé non protéique γ -acide aminé butyrique (GABA), lequel, sous les conditions de stress, peut représenter une fraction significative du pool d'acide aminés libres (Bown & Shelp, 1989). Les niveaux intracellulaires du GABA sont typiquement bas, mais, ils s'élèvent rapidement en réponse à des stress abiotiques sévères, à savoir l'hypoxie, la sécheresse, le froid, le choc thermique et la stimulation mécanique. Il est synthétisé par le glutamate décarboxylase (GAD), puis,

métabolisé par le GABA transaminase (*GABA-T*) et le Semi Aldéhyde Succinique Déshydrogénase (*SSADH*) avant l'intégration dans le cycle de Krebs (Mazzucotelli *et al.*, 2006; Baum *et al.*, 1993). Sur la figure 23, on peut voir que le gène *GAD* est induit par la sécheresse. Le transcrit est présent dans l'ensemble des échantillons des diverses variétés d'orge.

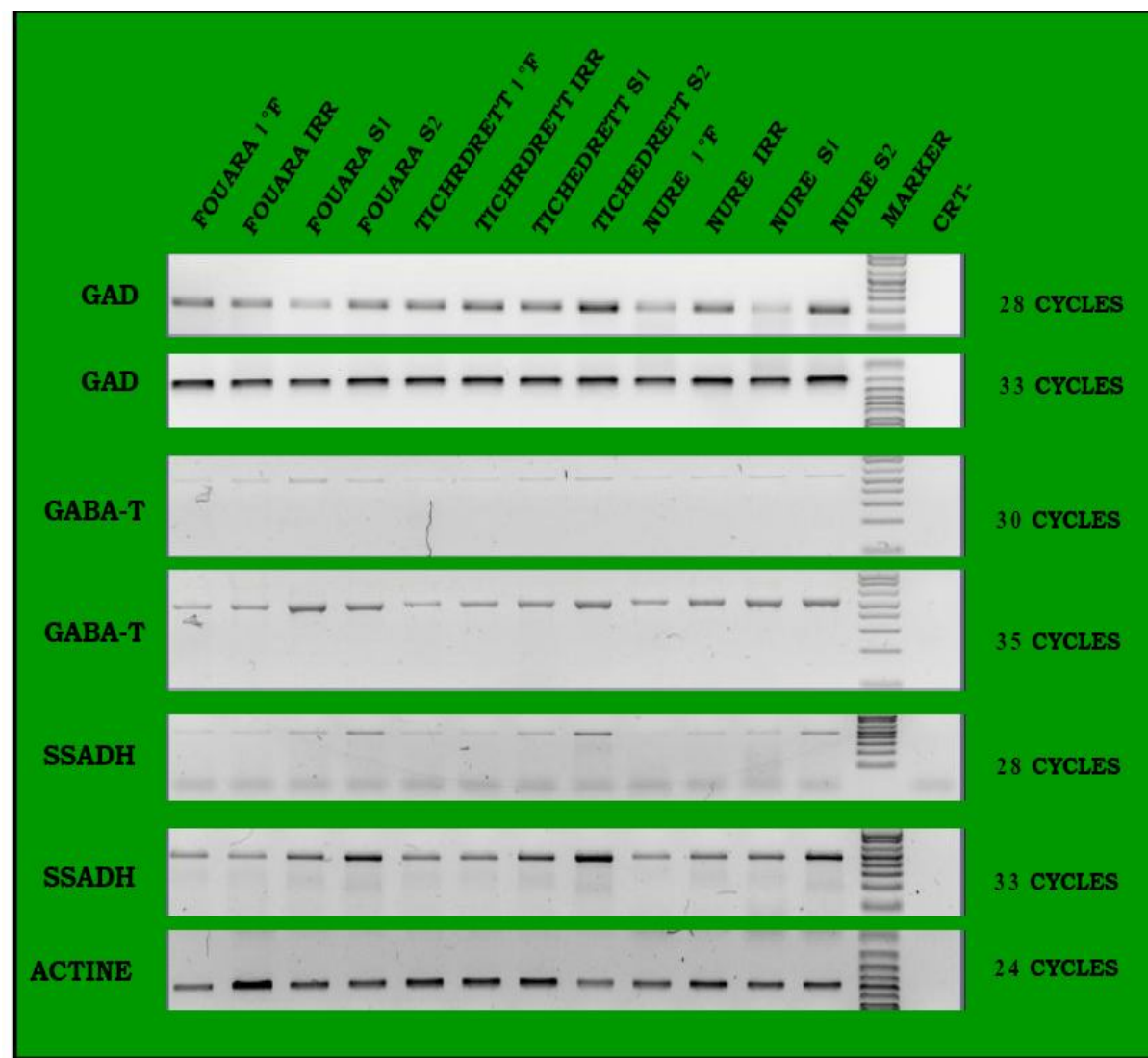


Figure 23. Expression des enzymes impliquées dans le *Gaba-Shunt*, dans le tissu foliaire de trois cultivars d'orge (1°F: 1^{ière} feuille une semaine après le semis; IRR = 95% CCP, S1 = 40% CCP, S2= 20% CCP).

Toutefois, dans les variétés Tichedrett et Nure l'induction du gène *GAD* dans les échantillons S2 (20% CCP) est y plus marquée que chez la variété Fouara. Le gène *GABA-T* (*GABA Transaminase*) est faiblement exprimé dans

l'ensemble des échantillons analysés quand bien même après 35 cycles d'amplification, est visible une induction du transcrit correspondant, en réponse à la sécheresse dans les échantillons S1 et S2 (respectivement équivalents à 40% et 20% de la CCP) en mode égal dans les trois variétés. Le gène *SSADH* est exprimé dans l'ensemble des échantillons, mais il est évident que son induction est fonction de sécheresse et l'accumulation du mRNA correspondant est majeure dans les échantillons S2 de la variété Tichedrett.

4. 2. ACCUMULATION DE PROLINE

L'accumulation de la proline durant le stress osmotique est due essentiellement à deux voies principales: la voie du glutamate et celle de l'ornithine (Roosens *et al.*, 1998). La *P5CS* (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase) est induite, spécifiquement, par la sécheresse, en particulier par le stress sévère (20% CCP) (Figure 24). D'après Zhu *et al.* (1998), les niveaux élevés de la proline, causés par la surexpression de *P5CS*, au sein des plantes, améliorent leur tolérance à la sécheresse.

La variété Tichedrett présente une accumulation de mRNA, en condition S2, de *P5CS* nettement supérieur par rapport aux variétés Nuré "Fouara". La proline peut être accumulée en conditions de stress osmotique, hydrique et salin, via la voie à ornithine, par intervention de l'enzyme *OAT* (ornithine δ -aminotransférase). Sur la figure 24, apparaît que le gène *OAT* est induit par le déficit hydrique. Le transcrit du gène *OAT* est, déjà, présent dans les échantillons contrôles, aussi bien au stade de la première feuille (1°F) que dans les plantes irriguées, qui ont atteint le stade de la septième feuille et augmente d'intensité en mode graduelle avec l'élévation et l'accentuation du stress hydrique.

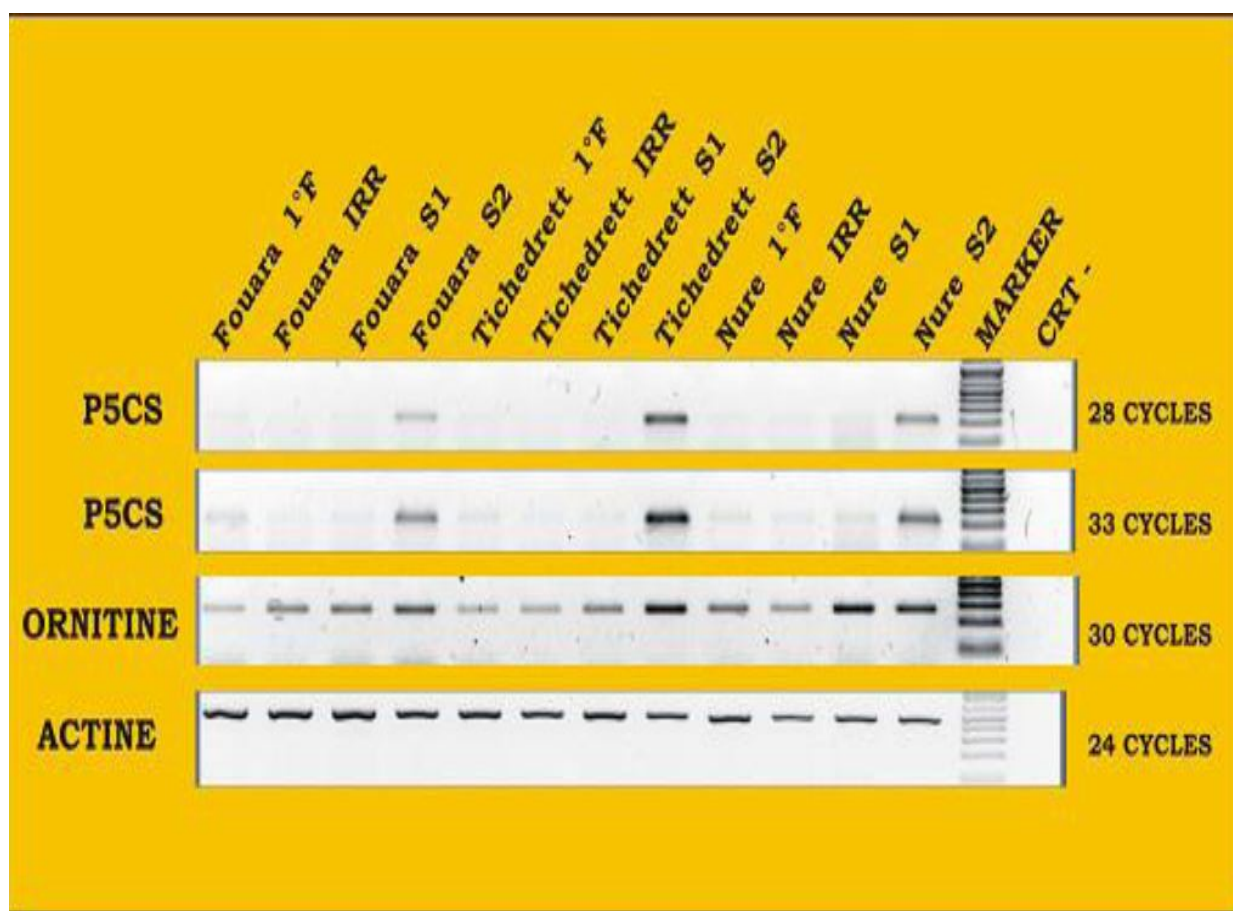


Figure 24. Expression du *P5CS* (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase) et de l'Ornithine δ -aminotransférase dans le tissu foliaire de trois cultivars d'orge (1°F: 1^{ière} feuille une semaine après le semis; IRR = 95% CCP, S1 = 40% CCP, S2= 20% CCP).

4.3. LES DEHYDRINES

Appartenant à la famille *LEA*, les déhydrines jouent un grand rôle dans la protection de la structure cellulaire des effets du déficit hydrique (Close, 1997). Il existe des déhydrines basiques, qui s'expriment durant les événements de déshydratation, et des déhydrines acides, impliquées dans l'acclimatation au froid. Close *et al.* (2000) reconnaissent que lors de la déshydratation, cette famille génique est hautement régulée. Sur la figure 25, la *DHN8* (une déhydrine acide de l'orge homologue à la déhydrine acide *WCOR410* du blé) chez Nuré Tichedrett, s'exprime fortement dans les

échantillons sévèrement stressés (S2), contrairement à "Fouara", où, elle s'exprime plus faiblement.



Figure 25. Analyse de l'expression du gène *DHN8* dans le tissu foliaire de trois cultivars d'orge ((1°F: 1^{ière} feuille une semaine après le semis; IRR = 95% CCP, S1 = 40% CCP, S2= 20% CCP).

DISCUSSION GENERALE

La culture des céréales reste une spéculation préoccupante et prédominante de l'agriculture algérienne. Dominante de par les superficies qu'elle occupe et préoccupante de par la variation de la production dont elle sujette. Quoiqu'elle a connu des augmentations sensibles, passant de près de 18 millions de quintaux au début des années 1960 à plus de 35 millions de quintaux à la veille de la deuxième décennie de ce troisième millénaire, la production réalisée n'arrive pas à couvrir des besoins de plus en plus importants, dépassant les 110 millions de quintaux vers l'horizon 2015. Cette faible performance de la céréaliculture algérienne a plusieurs origines dont le manque d'eau, ou sécheresse, constitue le principal facteur limitant (Chennafi *et al.*, 2006). La sécheresse représente tout manque d'eau qui ne permet pas à la plante cultivée d'exprimer le rendement qu'elle pourrait donner en situation favorable. Une variété tolérante à la sécheresse est, dans ce cas, celle qui produit de manière satisfaisante en présence de la contrainte (Tardieu, 2004).

Les résultats de diverses études s'accordent à préconiser que l'objectif de la sélection des variétés destinées aux zones arides et semi-arides doit se focaliser sur la recherche de la tolérance aux stress abiotiques afin d'arriver à une meilleure adaptation à la variabilité, de nature imprévisible, du milieu de production. Ceci nécessite la caractérisation du milieu de production pour identifier les stress les plus fréquents auxquels la culture est sujette, pour leur trouver une stratégie d'évitement ou une source génétique de tolérance (Adjabi *et al.*, 2007). Une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques et génétiques, qui sont à la base de la tolérance à la sécheresse, chez le blé dur, est nécessaire pour développer des variétés plus adaptées et performantes.

Dans le cas du blé dur, la sélection est faite à partir des introductions des Centres Internationaux de la Recherche Agronomique. Les variétés sélectionnées réussissent bien, en général, sur les plaines intérieures et le littoral, mais leurs performances restent très variables et limitées sur les

hauts plateaux où est localisé l'essentiel des superficies de cette culture. Les nouvelles variétés, adoptées par la production, ont été sélectionnées sur la base du rendement grain sans tenir compte des caractères adaptatifs qui sont des régulateurs du rendement en milieux variables (Adjabi *et al.*, 2007 ; Benmahammed *et al.*, 2010 ; Kadi *et al.*, 2010, Meziani *et al.*, 2001, Nouar *et al.*, 2012).

L'amélioration de la tolérance du blé dur à la contrainte hydrique se fait essentiellement de manière empirique, sur la base du rendement grain qui est l'objectif de la production (Benmahammed *et al.*, 2010). Les sélections issues de cette approche valorisent moins les milieux favorables, ce qui limite le progrès génétique à réaliser (Nouar *et al.*, 2012). La recherche de variétés de blé dur tolérantes au stress hydrique est aussi abordée en utilisant les paramètres physiologiques (Fellah *et al.*, 2002 ; Adjabi *et al.*, 2007 ; Bahlouli *et al.*, 2008 ; Benmahammed *et al.*, 2010 ; Richards *et al.*, 2010). L'utilisation des marqueurs moléculaires est plus récente (Neffar *et al.*, 2011).

Nouar *et al.*, (2012), étudiant le comportement de 12 génotypes de blé dur sur différents sites, rapportent la présence de l'interaction génotype x milieux. Ceci suggère la présence de facteurs limitants, dont l'expression est variable selon les milieux et rend nécessaire la recherche de génotypes associant performances de rendement grain et adaptabilité à la variation des milieux (Annichiarico *et al.*, 2005 ; 2006 ; 2010 ; Benmahammed *et al.*, 2010, Kadi *et al.*, 2010, Meziani *et al.*, 2011). Ces différentes recherches rendent compte de la difficulté, de la pertinence et de l'utilité de conduire de pareilles études pour mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la résistance à la sécheresse pour sélectionner des génotypes performants et résilients.

La présente étude est une continuité dans cet axe de recherche. Les résultats obtenus indiquent que du point de vue physiologique les cultivars d'orge développent différentes stratégies pour contrer le stress hydrique. Ainsi le cultivar Tichedrett, sous stress modéré, maintient un niveau de

croissance similaire à celui du témoin irrigué. En revanche, cette variété se montre plus sensible au stress hydrique sévère.

L'expression de différents gènes et l'accumulation de divers osmolytes sont les principaux mécanismes de tolérance au déficit hydrique (Jia *et al.*, 2008). Les résultats de l'étude moléculaire montrent que Tichedrett, et à un degré moindre Nuré, présentent, sous stress hydrique sévère, l'accumulation rapide de transcrits des gènes contrôlant la biosynthèse des molécules osmo-protectrices (*P5CS*, *SSADH*, *GAD*, *DHN8*) et la régulation post-traductionnelle de la dégradation des protéines (*6G2*). Ces gènes sont sous exprimés chez la variété Fouara. La différence génotypique entre tolérant et sensible est, donc, associée à une modification de l'expression des gènes. Ces résultats suggèrent que Tichedrett et Nuré, en réponse au stress hydrique, mettent en marche la machinerie pour synthétiser les molécules osmo-protectrices, nécessaires à l'ajustement osmotique. Ces variétés sont donc tolérantes au stress hydrique. Le cultivar Fouara adopte le mécanisme d'évitement en réponse au stress hydrique, en limitant les pertes d'eau par transpiration.

Ces résultats corroborent ceux d'autres études. Ainsi selon Chaves *et al.*, (2009), la fermeture stomatique est un processus clé du contrôle de l'état hydrique de la plante. Elle s'accompagne d'une réduction de l'assimilation de CO₂ et d'une augmentation de la température vu que la transpiration contribue à dissiper une partie de l'énergie radiative incidente. L'existence de la variabilité génotypique pour la conductance stomatique, la fermeture des stomates et l'assimilation nette, sous stress hydrique est rapportée par plusieurs auteurs (Chaves *et al.*, 2009 ; Poormohamad Kiani *et al.*, 2007 ; Casadebaig *et al.*, 2008).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats de l'analyse physiologique et moléculaire mettent en évidence les stratégies adoptées par les différentes variétés pour contrer le stress hydrique. Ainsi Tichedrett met en action des mécanismes de tolérance en activant les voies enzymatiques de biosynthèse des osmolytes, pour assurer l'ajustement osmotique. A l'inverse Fouara adopte la stratégie de l'évitement comme mécanisme pour contrer le stress hydrique en limitant les pertes d'eau par transpiration. L'expression des gènes change en fonction du stade végétatif, de la variété et du degré de stress hydrique, suggérant que la régulation de l'expression des gènes CBFs est plus complexe que prévu. Elle semble affectée par des facteurs liés au développement végétatif (stades végétatifs) et à l'environnement (intensité du stress). Les gènes impliqués dans l'accumulation des osmolytes sont exprimés sous stress sévère, chez les trois génotypes d'orge étudiés, suggérant la mise en œuvre de l'ajustement osmotique comme mécanisme de tolérance du stress hydrique.

Comme perspectives à cette étude préliminaire, il semble important de vérifier les résultats obtenus par d'autres des études complémentaires, qui portent sur d'autres génotypes pour élargir la variabilité génotypique, et concentrer le travail sur l'expression des gènes à des stades plus tardifs, vu que le milieu de production se caractérise surtout par des stress de fin de cycle. L'étude physiologique doit s'étendre à l'analyse des paramètres aussi importants que la conductance stomatique, le potentiel osmotique, le contenu en chlorophylle et la fluorescence chlorophyllienne, entre autres. Une analyse de l'expression d'un nombre plus grand de gènes (array), et pour différents scénarios de stress hydrique mérite d'être conduite afin d'effectuer une analyse plus exhaustive des gènes impliqués dans la tolérance du blé dur et de l'orge à la sécheresse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abe, H., K. Yamaguchi-Shinozaki, T. urao, T. Iwasaki, D. Hosokawa, K. Shinozaki, 1997. Role of *Arabidopsis* *MYC* and *MYB* homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, **9**: 1859-1868.
2. Abebe, T., A. C. Guenzi, B. Martin, J. C. Cushman, 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol*, 131: 1748-1755.
3. Adjabi, A., H. Bouzerzour, C. Lelarge, A. Benmahammed, A. mekhlouf, A. Hannachi. 2007. Relationships between grain yield performance, temporal stability and carbon isotope discrimination in durum wheat (*Triticum durum* desf.) under Mediterranean conditions. *Journal of agronomy*, **6** : 294-301.
4. Alves, A.C., T.L. Setter. 2004. Response of cassava leaf area expansion to water deficit: Cell proliferation, cell expansion and delayed development. *Annals of Botany*, **94**: 605–613.
5. Annichiarico, P., F. Bellah, T. Chiari, 2005. Defining subregions and estimating benefits for a specific adaptation strategy by breeding programs: a case study. *Crop Sci.*, **45** : 1741-1749.
6. Bajji M, S. Lutts, J.M. Kient. 2001. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf aging in three durum wheat (*Triticum durum* Defs.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Sci.* **160** : 669-681.
7. Baker, S.S., K.S. Wilhelm, M.F. Thomashow. 1994. The 5' region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.*, **24**: 701–713.

8. Baum, G., Y. Chen, T. Arazi, H. Takatsuji, H. Fromm, 1993. A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning sequence and functional analysis. *J Biol Chem*, **268**: 19610-19617.
9. Benderradji, L., F. Brini, S. Ben Amar, K. Kellou, J. Azaza, K. Masmoudi, H. Bouzerzour, M. Hanin. 2011. Sodium transport in the seedlings of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes showing contrasting salt stress tolerance. *AJCS*, 5: 233-241.
10. Benmahammed, A. M. Kribaa, H. Bouzerzour, A. Djekoun. 2010. Assessment of stress tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) advanced breeding lines under semi-arid conditions of the eastern high plateaus of Algeria. *Euphytica*, **172**: 383-394.
11. Benmahammed, A., K.L. Hassous, H. Bouzerzour, 2001. Synthèse des performances des nouvelles sélections d'orge (*Hordeum vulgare* L.) réalisées par les stations ITGC de Saida, Sidi Bel Abbès, Tiaret, Beni Slimane, Oued Smar, Khémis Miliana, Sétif et Khroub, au cours de la période 1980/81 à 1996/97. *Céréaliculture*, **36**: 13-20.
12. Blum, A., R. Munns, J.B. Passioura, N.C. Turner, R.E. Sharp, J.S. Boyer, H.T. Nguyen, T.C. Hsiao. 1996. Genetically engineered plants resistant to soil drying and salt stress: how to interpret osmotic relations? *Plant Physiol.*, **110** : 1051-1053.
13. Borel, C., A. Frey, A. Marion-Poll, F. Tardieu, T. Simonneau, 2001. Does engineering ABA synthesis in *N. plumbaginifolia* modify stomatal response to drought? *Plant, Cell and Environment*, **24**: 477-489.
14. Bouchabke, O., F. Tardieu, T. Simonneau, 2006. Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays* L.) respond to evaporative demand in well-watered but not in water saturated soil. *Plant, Cell and Environment*, **29**: 1138-1148.

15. Bouché, N., H. Fromm. 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*, **9**:110-115.
16. Bown, A.W., B.J. Shelp, 1989. The metabolism and physiological roles of 4-aminobutyric acid. *Biochemistry. Life Science Advances*, 8: 21-25.
17. Bravo, L.A., J. Gallardo, A. Navarrete, N. Olave, J. Martinez, M. Alberdi, T. J. Close, L. J. Corcuera, 2003. Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Plant Physiol*, **118**: 262-269.
18. Bray, E.A., 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci*, **2**: 48-54.
19. Buchanan, B.B., W. Gruissem, R.L. Jones, 2003. *Biochimica e biologia molecolare delle piante. Zanichelli Ed.* 1261p.
20. Buitink J., J.L. Leger, I. Guisle, B. Ly-Vu, S. Wuillieme, G. Lamirault, A. Le Bars, N. LeMeur, A. Becker, K. Kuster, O. Leprince. 2006. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation sensitive to tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *Plant J.*, **47**: 735-750.
21. Buitink, J., O. Leprince, 2008. Analyse post-génomique de la tolérance à la dessiccation. *Journal de la Société de Biologie*, **202** : 213-222.
22. Burnet, M., P. Lafontaine, A.D. Hanson, 1995. Assay, purification and partial characterization of choline mono-oxygenase from spinach. *Plant Physiol*, **108**: 581-588.
23. Casadebaig P., P. Debaeke, J. Lecoœur. 2008. Threshold for leaf expansion and transpiration response to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. *European Journal of Agronomy*, **28**: 646-654.
24. Cattivelli, L., P. Baldi, C. Crosatti, N. Di Fonzo, P. Faccioli, M. Grossi, A.M. Mastrangelo, N. Pecchioni, A.M. Stanca, 2002. Chromosome

- regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticeae*. *Plant Molecular Biology*, **48**: 649-665.
25. Chaves, M.M., J. Flexas, C. Pinheiro, 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.*, **103**: 551-560.
 26. Chinnusamy, V., M. Ohta, S. Kanrar, B. Lee, X. Hong, M. Agarawal, J.K. Zhu, 2003. *ICE1*: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **17**: 1043-1054.
 27. Choi, D.W., E.M. Rodriguez, T.J. Close, 2002. Barley *Cbf3* gene identification, expression pattern and map location. *Plant Physiol*, **129**: 1781-1787.
 28. Close, T.J., 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Plant Physiol*, **97**: 795-803.
 29. Close, T.J., 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Plant Physiol*, **100**: 291-296.
 30. Close, T.J., D.W. Choi, M. Venegas, S. Salvi, R. Tuberosa, N. Ryabushkina, Y. Turusoev, E. Nevo, 2000. Allelic variation in wild and cultivated barley at the *Dhn4* locus, which encodes a major drought-induced and seed protein, *DHN4*. 8th *International Barley Genetics Symposium Adelaide Australia*.
 31. Condon, A.G., R.A. Richards, G.J. Rebetzke, G.D. Farquhar. 2002. Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop Sci.*, **42** : 122-131.
 32. Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the cell wall. *Nature Rev. Molecular Cell Biology*, **6**:850-861.

33. Cushman, J.C., G. Meyer, C.B. Michalowski, J.M. Schmitt, H.J. Bohnert. 1989. Salt stress leads to the differential expression two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during Crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Cell*, **1**: 715–725.
34. DaCosta M., Z. Wang, and B. Huang. 2004. Physiological adaptation of Kentucky bluegrass to localized soil drying. *Crop Sci.* **44**:1307-1314.
35. Danyluk, J., A. Perron, M. Houde, A. Limin, B. Fowler, N. Benhamou, F. Sarhan, 1998. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, **10**: 623-638.
36. De Leonardis A.M., D. Marone, E. Mazzucotelli, F. Neffar, F. Rizza, N. Di Fonzo, L. Cattivelli, A.M. Mastrangelo. 2007. Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. *Plant Science*, **172**: 1005-1016.
37. De Leonardis, A.M., M. Petrarulo, P. De Vita, A.M. Mastrangelo. 2010. Genetic and molecular aspects of plant response to drought in annual crop species. www.intechopen.com/download/pdf/35823
38. Delauney, A., D.P.S. Verma, 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*, **4**: 215-223.
39. Dong, C.H., M. Agarwal, Y. Zhang, Q. Xie, J.K. Zhu. 2006. The negative regulator of plant cold responses, *HOS1*, is a RING *E3* ligase that mediates the ubiquitination and degradation of *ICE1*. *Proc Nat Acad Sci USA*, **103**: 8281-8286.
40. Dong, J., C. Chen, Z. Chen. 2003. Expression profile of the *Arabidopsis* *WRKY* gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol.*, **51**: 21-37.

41. Du, L., Z. Chen. 2000. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **24** : 837-847.
42. Dubouzet, J.G., Y. Sakuma, Y. Ito, M. Kasuga, E.G. Dubouzet, S. Miura, M. Seki, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki. 2003. *Os-DREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.*, **33**: 751-763.
43. Ergen, N.Z., J. Thimmapuram, H.J. Bohnert, H. Budak. 2009. Transcriptome pathways unique to dehydration tolerant relatives of modern wheat. *Functional and Integrative Genomics*, **9**: 377–396.
44. Eulgem, T., P.J. Rushton, S. Robatzek, I.E. Somssich. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Science.*, **5**: 199-206.
45. Fleury. D., S. Jefferies, H. Kuchel, P. Langridge. 2010. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, **61** : 3211–3222.
46. Fowler, S.G., M.F. Thomashow. 2002. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell.*, **14**: 1675-1690.
47. Francia, E., F. Rizza, L. Cattivelli, A.M. Stanca, G. Galiba, B. Toth, P.M. Hayes, J.S. Skinner, N. Pecchioni. 2004. Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a Nure (winter)X Tremois (spring) barley map. *Theor Appl Genet.*, **108**: 670-680.
48. Gill, G., 2004. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes & Development*, **18**: 2046-2059.

49. Gilmour, S.J., D.G. Zarka, E.J. Stockinger, M.P. Salazar, J.M. Houghton, M.F. Thomashow. 1998. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J.*, **16** : 433-442.
50. Goyeau, H., K. Ammar, J. Berder. 2010. Virulence in *Puccinia triticina* for Durum Wheat Cultivar Creso and Other Durum Wheat Cultivars Carrying Resistance Gene *Lr14a* in France. *Plant disease*, 94: 1068-1070.
51. Granier, C., D. Inzé, F. Tardieu. 2000. Spatial distribution cell division rate can be deduced from that of *P34^{cdc2}* kinase activity in maize leaves grown in contrasting conditions of temperature and water status. *Plant Physiol.*, **124**: 1393-1402.
52. Gupta, P., P. Langridge, R. Mir. 2010. Marker-assisted wheat breeding: Present status and future possibilities. *Molecular Breeding*, **26**:145-161.
53. Haake, V., D. Cook, J.L. Riechmann, O. Pineda, M.F. Thomashow, J.Z. Zhang. 2002. Transcription factor *CBF4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **130**: 639-648.
54. Hinch, D.K., M. Hagemann. 2004. Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem J.*, **383**: 277-283.
55. Houde, M., S. Dallaire, D. N'Dong, F. Sarhan. 2004. Overexpression of the acidic dehydrin *WCOR410* improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnol J.*, **2**:381-7.
56. Ingram, J., D. Brtels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, **47**: 377-403.

57. Jaglo, K.R., S. Kleff, K.L. Amundsen, X. Zhang, V. Haake, J.Z. Zhang, T. Deits, M.F. Thomashow. 2001. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-responsive pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.*, **127**: 910-917.
58. Jaglo, K.R., S.J. Gilmour, D.G. Zarka, O. Schabenberger, M.F. Thomashow. 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, **280**: 104-106.
59. Jaubert, S., T.N. Ledger, J.B. Laffaire, C. Piotte, P. Abad, M.N. Rosso. 2002. Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **121**: 205-211.
60. Jia, X.I., CYi Xu, R. L. Jing, R.Z. Li, X.G. Mao, J.P. Wang, X.P. Chang. 2008. Molecular cloning and characterization of wheat CalRetTiculin (CRT) gene involved in drought-stressed responses. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 739-751.
61. Jofuku K.D., B.G.M. Den Boer, M. Van Montagu, J.K. Okamoto. 1994. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell.*, **6** : 1211-1225.
62. Kadi Z., F. Adjel, H. Bouzerzour. 2010. Analysis of the genotype x environment interaction of Barley grain yield (*Hordeum vulgare* L.) under semiarid conditions. *Advance in Environmental Biology*, **4**: 34-40.
63. Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki. 1999. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.*, **17**: 287-291.
64. Kavi Kishor, P.B., Z. Hong, G.H. Miao, C.A.A. Hu, D.P.S. Verma. 1995. Overexpression of Δ^1 -pyrroline 5-carboxylate synthetase increases

- proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.*, **108**: 1387-1394.
65. Kim, C.Y., S. Zhang. 2004. Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces *WRKY* family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J.*, **38**: 142-151.
 66. Knight, H., 2000. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *International Review of Cytology*, **195**: 269-325.
 67. Knight, H., E.L. Veale, G.J. Warren, M.R. Knight. 1999. The *sfr6* mutation in *Arabidopsis* suppresses low-temperature induction of genes dependent on the *CRT/DRE* sequence motif. *Plant Cell.*, **11**: 875-886.
 68. Kume, S., M. Kobayashi, M. Ishibashi, R. Ohno, C. Nakamura, S. Takumi. 2005. Differential and coordinated expression of *Cbf* and *Cor/Lea* genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance. *Genes Genet Syst.*, **80**: 185-197.
 69. Leprince, O., G.A.F. Hendry, B.D. McKersie. 1993. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci Res.*, **3** : 231-246.
 70. Levitt J. 1982. Responses of plants to environmental stresses. *Academic Press*, New York.
 71. Li, S., S. Dean, Z. Li, J. Horecka, R.J. Deschenes, J.S. Fassler. 2002. Two component histidine kinase *Sln1p* regulates *OCH1* via the transcription factor, *Skn7p*. *Mol Biol Cell.*, **13**: 412-424.
 72. Ligterink, W., H. Hirt. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int Rev Cytol.*, **201**: 209-275.

73. Liu, L., M.J. White, T.H. MacRae. 1999 Transcription factors and their genes in higher plants: functional domains, evolution and regulation. *Eur J Biochem.*, **262**: 247-257.
74. Liu, Q., M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki. 1999. Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an *EREBP/AP2* DNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, **10** : 1391-1406.
75. Lizana, C., M. Wentworth, J.P. Martinez, D. Villegas, R. Meneses, E.H. Murchie, C. Pastenes, B. Lercari, P. Vernieri, P. Horton, M. Pinto. 2006. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress. I. Effects of drought on yield and photosynthesis. *J. Exp. Bot.*, **57**: 685–697.
76. Maccaferri, M., M.C. Sanguineti, M. Donini, R. Tuberosa. 2003. Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm *Theor Appl Genet*, **107**:783–797.
77. Mahajan, S., N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives Biochem and Biophysic.*, **444**: 139-158.
78. Marè, C., E. Mazzucotelli, C. Crosatti, E. Francia, A.M. Stanca, L. Cattivelli. 2004. *Hv-WRKY 38/* a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Mol Biol.*, **55**: 399-416.
79. Martinez, J.P., H. Silva, J.F. Ledent, M. Pinto. 2007. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Europ. J. Agronomy*, **26**: 30–38.

80. Mastrangelo, A. M., S. Belloni, S. Barilli, B. Ruperti, N. Di Fonzo, A.M. Stanca, L. Cattivelli. 2005. Low temperature promotes intron retention in tow *e-cor* genes of durum wheat. *Planta*, **221**: 705-715.
81. Mazzucotelli, E., A.M. Mastrangelo, C. Crosatti, D. Guerra, A.M. Stanca, L. Cattivelli. 2008. Abiotic stress response in plants: when post-transcriptional and posttranslational regulations control transcription, *Plant Science*, **174** :420–431.
82. Mazzucotelli, E., A.Tartari, L. Cattivelli, G. Forlani. 2006. Metabolism of γ -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. *J Experim Bot.*, **57**: 3755-3766.
83. Menkes, K., U. Schindler, A.R. Cashmore. 1995. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by CBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci.*, **20**: 506-510.
84. Miller, A.K., G. Galiba, J. Dubcovsky. 2006. A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus *Fr-Am2* in *Triticum monococcum*. *Mol Gen Genomics*, **275**: 193-203.
85. Miller, W.A., P.M. Waterhouse, J.W.S. Brown, K.S. Browning. 2001. The RNA world in plants: post-transcriptional control III. *Plant Cell*, **13**: 1710-1717.
86. Mizoguchi, T., K. Irie, T. Hirayama, N. Hayashida, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Matsumoto, K. Shinozaki. 1996. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen- activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 765-769.

87. Mohammadi, M., N.N. Kav, M.K. Deyholos. 2008. Transcript expression profile of water-limited roots of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Opata. *Genome*, **51**: 357–367.
88. MSTATC. 1991. A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. MSTAT Development Team. Michigan State University. USA.
89. Munns, R., R.A. James, A. Lauchli. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.*, **27**: 1025- 1043.
90. Neffar F. , C. Marè, H. Bouzerzour. 2011. Study of Barley (*Hordeum vulgare* L) Transcript Profiles Under Water Stress Conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5 : 1481-1488.
91. Newton, C.R., A. Graham.1994. PCR: Basic principles and methods. *Eng-Bios Scientific Publishers, Oxford*.
92. Ober, E.S., R.E. Sharp. 1994. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. *Plant Physiol.*, **105**: 981-987.
93. Oosterom, V.E.J., S. Ceccarelli, J.M. Peacock,1993. Yield response of barley to rainfall and temperature in Mediterranean environments. *Journal of Agricultural Science*, **121**: 307-313.
94. Pang, X.B., X.G. Mao, R.L. Jing, J.F. Shi, T. Gao, X.P. Chang, Y.F. Li. 2007. Analysis of gene expression profile response to water stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *Acta Agronomica Sinica*, **33**: 333–336.
95. Pesci, P., A. Beffagna. 1984. inhibiting effect of fusicoccin on abscisic acid induced proline accumulation in barley leaves. *Plant Sci. Letters*, **37**: 7-12.

96. Poormohammad Kiani S., P. Talia, P. Maury, P. Grieu, R. Heinz, A. Perrault, V. Nishinakamasu, E. Hopp, L. Gentzbittel, N. Paniego, A. Sarrafi. 2007. Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science*, **172** : 773-787.
97. Prasad, P.P.V., S. A. Staggenborg, Z. Ristic. 2008. Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. Chap Book, "Response of crops to limited water: Understanding and modeling water stress effects on plant growth processes". *Advances in Agricultural Systems Modeling Series 1*, ASA, CSSA, SSSA, eds., 301-355.
98. Rampino, P., S. Pataleo, C. Gerardi, G. Mita G, C. Perrotta. **2006**. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell Environ.*, **29**: 2143-2152.
99. Rebetzke, G.J., A.G. Condon, G.D. Farquhar, R. Appels, R.A. Richards. 2008. Quantitative trait loci for carbon isotope discrimination are repeatable across environments and wheat mapping populations. *Theoretical and Applied Genetics*, **118** :123–137.
100. Reynolds, M., Y. Manes, A. Izanloo, P. Langridge. 2010. Phenotyping approaches for physiological breeding and gene discovery in wheat. *Annals of Applied Biology*, **155** : 309–320.
101. Richards, R.A., G.J. Rebetzke, M. Watt, A.G. Condon, W. Spielmeyer, R. Dolferus. 2010. Breeding for improved water productivity in temperate cereals: Phenotyping, quantitative trait loci, markers and the selection environment. *Functional Plant Biology*, **37**: 85–97.
102. Rizhsky, L., H.J. Liang, J. Shuman, V. Shulaev, S. Davletova, R. Mittler. 2004. When Defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a

- combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.*, **134**: 1683–1696.
103. Roosens, N.H., T.T. Thu, H.M. Iskander, M. Jacobs. 1998. Isolation of the *ornithine-delta-aminotransferase* cDNA and effects of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **117**: 263-271.
 104. Sanders, D., C. Brownlee, J.F. Harper. 1999. Communicating with calcium. *Plant Cell*, **11**: 691-706.
 105. Seki, M., M. Narusaka, J. Ishida, T. Nanjo, M. Fujita, Y. Oono, A. Kamiya, M. Nakajima, A. Enju, T. Sakurai, M. Satou, K. Akiyama, T. Taji, K. Yamaguchi-Shinozaki, P. Carninci, J. Kawai, Y. Hayashizaki, K. Shinozaki. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.*, **31**: 279-292.
 106. Sharma, A., M. Isogai, T. Yamamoto, K. Sakaguchi, J. Hashimoto, S. Komatsu. 2004. A novel interaction between calreticulin and ubiquitin-like nuclear protein in rice. *Plant Cell Physiology*, **45**: 684–692.
 107. Shen, Q., P. Zhang, T.H. Ho. 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell*, **8**: 1107-1119.
 108. Yamaguchi-Shinozaki K, K. Shinozaki. 2006. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annual Review of Plant Biology*, **57**: 781–803
 109. Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 410-417.

110. Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol.*, **7**: 161-167.
111. Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.*, **115**: 327-334.
112. Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **58**: 221-227.
113. Sinclair, R., W.N. Venable. 1983. An alternative method for analyzing pressure – volume curves produced with the pressure chamber. *Plant Cell Environ.*, **6** : 211-217.
114. Skinner, J.S., J. von Zitzewitz, P. Szucs, L. Marquez-Cedillo, T. Filichkin, K. Amundsen, E.J. Stockinger, M.F. Thomashow, T.H. Chen, P.M. Hayes. 2005. Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant Mol. Biol.*, **59**: 533-551.
115. Snedden, W.A., N. Koutzia, G. Baum, H. Fromm. 1996. Activation of a recombinant *petunia* glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain. *J Biol Chemistry*, **271**: 4148-4153.
116. Steel, R.G.D., J.H. Torrie, 1982. Principles and procedures of statistics. *McGraw-Hill Books*, New York.
117. Stockinger, E.J., S.J. Gilmour, M.F. Thomashow. 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 1035-1040.

118. Tal, M., I. Rosenthal. 1979. Salt tolerance in *Simmondsia chenensis* water balance and accumulation of chloride sodium and proline under low and high salinity. *Ann Bot.*, **34**: 701-708.
119. Tardieu, F., T. Simonneau. 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental*, **49**: 419-432.
120. Tardieu F. 2004. Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends in Plant Science*, **8** : 9-14.
121. Tardieu, F., Reymond, M., Hamard, P., Granier, C., Muller, B., 2000. Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *J. Exp. Bot.*, **51**: 1505-1514.
122. Tardieu, F., W.J. Davies. 1993. Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. *Plant, Cell and Environment.*, **16**: 341-349.
123. Tester, M., P. Langridge. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, **327**: 818-822.
124. Thomashow, M.F., 1994. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In E Meyrowitz, C Somerville (ed.), *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY. Pp: 807-834.
125. Thomashow, M.F., S.J. Gilmour, E.J. Stockinger, K.R. Jaglo-Ottosen, D.G. Zarka. 2001. Role of the *Arabidopsis* CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Plant Physiol.*, **112**: 171-175.

126. Triboulot, M.B., M. Brosché, J. Renaut, L.Jouve, D. Le Thiec, P. Fayyaz, B. Vinocur, E. Witters, K. Laukens, T. Teichmann, A. Altman, J.F. Hausman, A. Polle, J. Kangasjärvi, E.Dreyer. 2007. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a Poplar growing in Arid Regions. *Plant Physiol.*, **143**: 876–892.
127. Umezawa, T., M. Okamoto, T. Kushiro, E. Nambara, Y. Oono, M. Seki, M. Kobayashi, T. Koshiba, Y. Kamiya, K. Shinozaki. 2006. CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **46**: 171-182.
128. Urao, T., B. Yakubov, R. Satoh, K. Yamaguchi-Shinozaki, M. Seki, T. Hirayama, K. Shinozaki. 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell.*, **11**: 1743-1754.
129. Urao, T., T. Katagiri, T. Mizoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, N. Hayashida, K. Shinozaki. 1994. Two genes that encode Ca^{2+} -dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet.*, **224**: 331-340.
130. Vinocur, B., A. Altman. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotech.*, **16**: 123-132.
131. Vranova, E., S. Atichartpongkul, R. Villarroel, M.V. Montagu, D. Inzé, W. Van Camp. 2002. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proc Nat Acad Sci.*, **99** : 10870-10875.
132. Wakabayashi, K., T. Hoson, S. Kamisaka. 1997. Changes in amounts and molecular mass distribution of cell-wall polysaccharides of wheat

- (*Triticum aestivum* L) coleoptiles under water stress. *J. Plant Physiol.*, **151**: 33–40.
133. Wood, A.J., H. Saneoka, D. Rhodes, R.J. Joly, P.B. Goldsbrough. 1996. Betain aldehyde dehydrogenase in Sorghum. *Plant Physiol.*, **110**: 1301-1308.
 134. Xu, D., X. Duan, B. Wang, D. Hong, T.H.D. Ho, R. Wu. 1996. Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, *HVA1*, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiol.*, **110** :249-257.
 135. Xue, G.P. 2002. An *AP2* domain transcription factor *HvCBF1* activates expression of cold-responsive genes in barley through interaction with a (G/a)(C/t)CGAC motif. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1577**: 63-72.
 136. Yamaguchi-Shinozaki, K., K. Shinozaki. 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, **10**: 88-94.
 137. Yamaguchi-Shinozaki, K., M. Kasuga, Q. Liu, K. Nakashima, Y. Sakuma, H. Abe, Z.K. Shinwari, M. Seki, K. Shinozaki. 2002. Biological mechanisms of drought stress response. *JIRCAS Working Report*, 1-8.
 138. Zhu, J.K., J. Liu, L. Xiong. 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell.*, **10**: 1181-1191.



Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner

Anna Maria De Leonardis ^{a,*}, Daniela Marone ^a, Elisabetta Mazzucotelli ^a,
Fahima Neffar ^{b,1}, Fulvia Rizza ^b, Natale Di Fonzo ^c,
Luigi Cattivelli ^a, Anna Maria Mastrangelo ^{a,d}

^a C.R.A.-Experimental Institute for Cereal Research, Section of Foggia, S.S. 16 km 675, 71100 Foggia, Italy

^b C.R.A.-Experimental Institute for Cereal Research, Section of Fiorenzuola d'Arda, Via S. Protaso 302, 29017 Fiorenzuola d'Arda (PC), Italy

^c C.R.A.-Experimental Institute for Cereal Research, Via Cassia 176, 00191 Rome, Italy

^d University of Molise, Department of Animal, Plant and Environmental Sciences, Via De Sanctis, 86100 Campobasso, Italy

Received 18 July 2006; received in revised form 30 January 2007; accepted 5 February 2007

Available online 9 February 2007

Abstract

A set of 10 durum wheat genes isolated as early induced in response to cold and light and 10 *Cbf* genes were tested for their expression in a range of durum wheat samples obtained from plants at different stages of development and exposed to different dehydration conditions. All tested genes showed some transcript accumulation also in response to water stress, indicating that each of them represents a target of the cold and dehydration signalling pathways. Gene expression profiles changed in response to water stress treatment in a way strictly dependent on developmental phase, tissue analysed and stress protocol applied. Significant differences were observed in dehydration-dependent transcript accumulation when durum wheat varieties, chosen on the basis of their tolerance to water stress, were analysed. Genes clearly up-regulated by water stress in some genotypes, but down-regulated in others were also found. Among the cultivars tested the most tolerant variety, Ofanto, showed the highest number of up-regulated genes. These findings also point out that a general frame of the molecular response to water stress cannot be drawn from the analysis of few experiments, rather the plant molecular response to dehydration changes continuously resulting from an integration of a series of internal and external stimuli.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Durum wheat; *e-cor* Genes; *Cbf* genes; Water stress

1. Introduction

Plant growth is greatly influenced by environmental stresses including water deficit, salinity and extreme temperatures. Molecular and biochemical response of plant to abiotic stress is a very complex task depending not only on the severity and duration of the stress event, but also on the developmental stage and morphological/anatomical parameters of the plants [1,2].

Soon after the perception and recognition of external changes, different signalling pathways are activated in order to convert a physical stress into a biochemical response, each of them promoting the expression of a set of stress-responsive genes; the full activation of all signal cascades induced by a given stress event promotes acclimation and leads to stress tolerance. Signal transduction requires the proper spatial and temporal coordination of all signalling molecules. Thus, molecules that participate in the modification, delivery, or assembly of signalling components, but do not directly relay the signal are also critical for the accurate transmission of stress signals, these include proteins modifiers (e.g., enzymes for protein lipidation, methylation, glycosylation, and ubiquitination), scaffold and adaptors [3].

* Corresponding author. Tel.: +39 0881 742972; fax: +39 0881 713150.

E-mail address: deleonardis@iscfoggia.it (A.M. De Leonardis).

¹ Permanent address: Université le Colonel Hadj Lakhdar, Département de Biologie végétale, Batna 5000, Algeria.

Article 2

Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(12): 1481-1488, 2011
ISSN 1991-8178

Study of Barley (*Hordeum vulgare* L) Transcript Profiles Under Water Stress Conditions

¹Fahima Neffar, ²Catemare Mare, ³Bouzerzour Hamenna

¹Depart of Biology, Faculty of Life and Natural Sciences, Hadj Lakhdar University, Batna, 5000 (Algeria).

²Istituto sperimentale per la Cerealicoltura Sezione di Fiorenzuola d'Arda (Italy) (Italy).

³Depart of Biology and Plant Ecology, Faculty of Life and Natural Sciences, Ferhat Abbas University, Setif, 19000 (Algeria).

Abstract: To understand the gene network controlling tolerance to drought stress, an experiment was conducted to study transcription profiles of two Algerians and one Italian barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. A number of important genes, reported to be involved in the regulation of cold stress, were differentially expressed under drought stress conditions in the different cultivars studied. Some genes (CBF6 and WRKY51) expression appeared to be genotype and growth stage dependant, showing no transcripts in Fouara cultivar at the 1st and the 7th growth stages and under all drought stress treatments, but exhibited transcripts in Nure at both growth stages and under stress and unstressed treatments, while transcripts of these genes were absent at an early growth stage in Tichedrett. 6G2 was expressed under moderate and severe drought conditions, in the three cultivars. Similarly the GAD, the P5CS, and the SSADH genes were specifically expressed under severe drought stress conditions which suggested that in an effort to maintain a continued supply of water, under severe drought stress conditions, the three genotypes under study actively accumulated osmolytes by triggering the above mentioned genes. From a more practical standpoint, the results suggest that caution should be exerted when transcriptome information obtained under conditions of water deficit imposed at an early growth stage are intended to be used for environment characterized by terminal drought stress, such as the case of the high plateaus of Algeria. The results indicated also that regulation of the CBFs expression is more complex than expected and as it appears to be mediated by different developmental and environmental signals.

Key words: Barley, CBFs genes, drought stress, transcript, regulation

INTRODUCTION

Durum wheat (*Triticum durum* Desf.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) are grown, in Algeria, under rainfed conditions, on the high plateaus, where drought represents a major limitation to crop production. Yield gap between irrigated and rainfed trials indicated that grain yield reduction owing to water deficit ranged from 24 to 80%, depending on rainfall amount and distribution patterns (Chenafi, H., 2006). Barley is grown by small farmers in a livestock - cereal production system. Low yield or crop failure of this crop had negative consequences on the durability of this agro system. Development of high yield and drought-resistant cultivars has been slow to not say nil, because of the presence of large genotype x environments interaction, causing inconsistency in yield performance in different environments, and the lack of specific methods for screening large numbers of genotypes for both yield potential and stress tolerance (Kadi, Z., 2010 ; Benmahammed, A., 2010; Meziani, N., 2011). Efforts are being made for a better understanding of plant drought tolerance mechanisms through molecular approaches (Diab, A.A., 2004 ; Cattivelli, L., 2008). Plants are thought to have common mechanisms, not only in terms of molecular and cellular responses, but also in terms of the biochemical and physiological responses, to adapt to stresses (Kang, J.Y., 2002).

The increased public availability of sequence data, favored extensive studies on expression profiling to identify genes involved in the responses to abiotic stresses (Hazen, S.P., 2005). Several genes whose transcription was associated with drought stress have been identified (Talamè, V., 2007). Most of these genes appeared to play essential roles in protecting plants from drought, cold or salinity through stress perception, signal transduction and transcriptional regulatory networks (Rabbani, M.A., 2003). Contribution of genomic-assisted breeding to the release of drought-resilient cultivars is somewhat marginal, even though some success has been reported. QTLs associated with root morphological traits have been incorporated using marker-assisted breeding (Bouche, N., F. Hillel, 2004). Progress has been made in developing transgenic plants over-expressing transcription factors involved in the regulation of stress-inducible genes (Shinozaki, K., 2003 ; Hu, H., 2008).

Corresponding Author: Bouzerzour Hamenna, Depart of Biology and Plant Ecology, Faculty of Life and Natural Sciences, Ferhat Abbas University, Setif, 19000 (Algeria).
E-mail: hbouzerzour50@gmail.com



Analysis of role of *Hv-WRKY38*, a transcription factor involved in cold- and drought response

C. Marè¹, E. Mazzucotelli², F. Neffar³, A.M. Mastrangelo², L. Cattivelli¹

1: CRA - Experimental Institute for Cereal Research, Section of Fiorenzuola d'Arda
- 29017 Fiorenzuola d'Arda (PC), Italy

2: CRA - Experimental Institute for Cereal Research, Section of Foggia
- 71100 Foggia (FG), Italy

3: - Département de Biologie, Université le Colonel Hadj-Lakhdar, 5000 Batna , Algérie.

The WRKY gene family represents one of major groups of plant-specific transcriptional regulators implicated in many different processes. This class of transcription factors is defined by an amino acid sequence with DNA-binding activity known as WRKY domain.

Hv-WRKY38 is a new gene coding for a WRKY protein in barley, whose expression is involved in low temperature and drought stress response. *Hv-WRKY38* is early and transiently expressed during exposure to low non-freezing temperature, in ABA-independent manner. Furthermore, it shows a continuous induction during dehydration and freezing treatments. Sub-cellular localization experiments showed the *Hv-WRKY38* protein accumulation into the nucleus of epidermal onion cells. Moreover, bacterially expressed *Hv-WRKY38* is able to bind *in vitro* to the W-box element (T)TGAC(C/T) also recognisable by other WRKY proteins. *Hv-WRKY38* genomic sequence was sequenced and mapped onto the centromeric region of the barley chromosome 6H. *Arabidopsis* and rice sequences homologous to *Hv-WRKY38* were also identified. To establish the role of *Hv-WRKY38* in the regulation of gene expression during stress response, we developed useful genetic backgrounds for functional studies. In particular ectopic over-expression was carried out in both monocot (wheat) and dicot (*Arabidopsis*) plants with an *in planta* high constitutive expression system. First evidences of phenotype analysis showed an earlier flowering time in *CaMV35S:Hv-WRKY38:NOS* transformants *Arabidopsis* vs wild type. Further evaluations of transgenic plants phenotype in stress conditions are currently in progress.

Poster Abstract - D.12

INFLUENCE OF GROWTH STAGE ON MOLECULAR RESPONSE OF DURUM WHEAT TO WATER STRESS

A.M. DE LEONARDIS*, F. NEFFAR**, L. CATTIVELLI*, A.M. MASTRANGELO*

*) Experimental Institute for Cereal Research section of Foggia, S.S. 16 km 675, 71100 Foggia, Italy -
mastrangelo@iscfoggia.it

**) Experimental Institute for Cereal Research section of Fiorenzuola d'Arda, Via S. Protaso 402, 29017
Fiorenzuola d'Arda, Italy

drought, durum wheat, growth stage

Physical stresses, particularly drought, place major limit on cereal productivity in Mediterranean environments which are undergoing a continuous decrease of mean rainfall.

The exposure of plant to abiotic stresses determines a physiological and molecular response depending, in initial phases, on a complex cascade of stress signal transduction in which few regulatory genes control many downstream genes that contribute to stress tolerance.

Many studies describe the expression profile of stress-related genes in early developmental stages, nevertheless the plant can react to stress in different ways if different phenological stages are considered, depending on the developmental processes in course.

In this work a set of 15 stress-related genes has been analysed for expression, in terms of transcript amount, in response to water stress in different tissues and phenological stages from the third leave to the physiological maturity (dough stage) in the Ofanto variety of durum wheat.

The tested genes were selected by means of two strategies based on an *in silico* and an experimental approach. In the first case, genes coding for transcription factors involved in abiotic stress response have been selected among wheat ESTs available in public databases. Different members of DREB/CBF family and a WRKY transcription factor have been assessed with specific primer couples.

In the second case, genes with a putative role in regulation of abiotic stress response on the basis of sequence homology and early expression following exposure to stress, have been chosen among those isolated from a subtractive library in which the oxidative stress, a common aspect to different abiotic stress types, was imposed by treating durum wheat plantlets to low temperature (3°C) in presence of light. The selected genes could be involved in the response to different stresses, included dehydration, in which the oxidative damage plays a key role.

Among the selected sequences some of them are putatively involved in the regulation of gene expression at transcriptional level, coding for zinc finger transcriptional factors, as well as at in post-transcriptional (RNA-binding proteins) or post-translational (ubiquitination and sumoylation pathways) control.

All tested genes appeared to be induced by stress in booting and flowering stages, while only some of them showed a clear response to the applied stress also in early stages and/or at physiological maturity, these results indicating a strong influence of developmental stage on gene responsiveness to water stress.

RESUME

L'objectif de cette étude était de tester des gènes de différentes catégories fonctionnelles, impliqués dans la réponse aux stress abiotiques, sur des cultivars d'orge de différentes origines. Les cultivars sont deux algériens ("Tichedrett" et "Fouara") et un italien ("Nure"), ils ont été exposés à différents régimes hydriques contrôlés par la mesure de la RSWC%. L'expérimentation a été conduite de manière à avoir deux niveaux de stress hydrique (S1 à 40% de RSWC et S2 à 20% de RSWC) et un régime contrôle à une RSWC de 95%. Une comparaison comportementale est effectuée avec un cultivar de blé dur « Ofanto » vu sa grande résistance vis-à-vis du stress hydrique.

La variété "Tichedrett", par rapport aux deux autres variétés, a montré une plus grande résistance vis-à-vis du stress imposé, et n'était nullement influencée par le stress à 40% de RSWC. Cette tolérance pourrait être traduite par l'importante accumulation des transcrits de différents gènes et d'osmolytes réputés pour leur implication dans la réponse aux effets de la sécheresse.

Mots clés: Orge, "Tichedrett", "Fouara", "Nure" RSWC%, Stress hydrique et expression génique.

SUMMARY

The aim of this study is to test different functional genes categories involved in abiotic stress response, in cultivars of different origin. The cultivars; two Algerian ("Tichedrett" and "Fouara") and one Italian ("Nure") have been subordinate to different water regimes for RSWC% monitoring. The experiment has been lead in such way to have two levels of water stresses (S1 at 40% of RSWC% and S2 at 20% of RSWC%) and a RSWC at 95%.

"Tichedrett" regarding the others two varieties, has shown a greater resistance to stress tax and it has not been minimally influenced from stress of 40% of RSWC. This tolerance can be explained from the greater accumulates of transcripts of different genes and osmolites known for their involvement in the water stress response.

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى اختبار جينات مختلف الوظائف، بالأخص تلك التي لها دور في الاستجابة للتوتر غير الحيوي، وذلك على عينات نبات الشعير من مناطق مختلفة. أختير لهذه الدراسة صنفين للشعير من أصل جزائري "Tichedrett" و "Fouara" وصنف إيطالي "Nure". عرضت الأصناف الثلاثة إلى حالات نقص في المياه والتي تمت مراقبتها بقياس النسبة المئوية لـ RSWC. طبقت الدراسة التجريبية بطريقة سمحت بالحصول على مستويين من التوتر المائي (S1 عند 40 % من RSWC و S2 عند 20% من RSWC). قورنت النتائج بالتجربة الشاهد عند 95 % من RSWC. تبين أن الصنف "Tichedrett" أكثر مقاومة للتوتر مقارنة بالصنفين الآخرين. حيث لم يبدي أي تأثير عند 40 % من RSWC. يمكن تفسير هذه المقاومة بالتراكم الكبير لمستنسجات مختلف الجينات والعناصر الأسمولارية المعروفة بدورها الفعال في الإستجابة لتأثيرات الجفاف.